(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 764 275**

(51) Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2015** **PCT/GB2015/052124**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016** **WO16012793**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2015** **E 15750093 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 3172319**

(54) Título: **Coronavirus**

(30) Prioridad:

23.07.2014 GB 201413020

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

(73) Titular/es:

THE PIRBRIGHT INSTITUTE (100.0%)
Ash Road, Pirbright, Woking
Surrey GU24 0NF, GB

(72) Inventor/es:

BICKERTON, ERICA;
KEEP, SARAH y
BRITTON, PAUL

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 764 275 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Coronavirus

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un coronavirus atenuado que comprende una variante de gen de la replicasa, que hace que el virus tenga una patogenicidad reducida. La presente invención también se refiere al uso de dicho coronavirus en una vacuna para prevenir y/o tratar una enfermedad.

Antecedentes de la invención

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) aviar, el agente etiológico de la bronquitis infecciosa (BI), es un patógeno altamente infeccioso y contagioso de las aves domésticas que se replica principalmente en el tracto respiratorio, pero también en las células epiteliales del intestino, riñón y oviducto. El IBV es miembro del Orden *Nidovirales*, Familia *Coronaviridae*, Subfamilia *Coronavirinae* y Género *Gammacoronavirus*; los coronavirus genéticamente muy similares causan la enfermedad en pavos, pintadas y faisanes.

Los signos clínicos de la BI incluyen estornudos, estertores traqueales, secreción nasal y respiración sibilante. Las aves de las que se aprovecha su carne tienen un aumento de peso reducido, mientras que las aves ponedoras ponen menos huevos y producen huevos de baja calidad. La infección respiratoria predispone a los pollos a infecciones bacterianas secundarias que pueden ser fatales en los polluelos. El virus también puede causar daño permanente en el oviducto, en especial, en polluelos, lo que conduce a una reducción de la producción y la calidad de los huevos; y en el riñón, conduciendo a veces a una enfermedad renal que puede ser fatal.

Se ha informado que el IBV es responsable de más pérdidas económicas para la industria avícola que cualquier otra enfermedad infecciosa. Aunque las vacunas vivas atenuadas y las vacunas inactivadas se usan universalmente en el control del IBV, la protección obtenida mediante el uso de la vacuna puede perderse debido a la descomposición de la vacuna o a la introducción de un nuevo serotipo de IBV que no esté relacionado con la vacuna usada, planteando un riesgo para la industria avícola.

Además, existe la necesidad en la industria de desarrollar vacunas que sean adecuadas para su uso *in ovo*, para mejorar la eficiencia y la rentabilidad de los programas de vacunación. Un desafío importante asociado con la vacunación *in ovo* es que el virus debe ser capaz de replicarse en presencia de anticuerpos maternos contra el virus, sin ser patógeno para el embrión. Las vacunas actuales contra el IBV se derivan después de múltiples pasadas en huevos embrionados, produciendo esto virus con patogenicidad reducida para los pollos, para que puedan usarse como vacunas vivas atenuadas. Sin embargo, dichos virus casi siempre muestran un aumento de la virulencia de los embriones y, por lo tanto, no pueden usarse para la vacunación *in ovo*, ya que reducen la capacidad de eclosión. En algunos casos, se observa una reducción del 70 % de la capacidad de eclosión.

La atenuación tras múltiples pasadas en huevos embrionados también presenta otras desventajas. Es un método empírico, pues la atenuación de los virus es aleatoria y diferirá cada vez que se pase el virus, por tanto, la pasada del mismo virus a través de una serie diferente de huevos con fines de atenuación conducirá a un conjunto diferente de mutaciones que conducirán a la atenuación. También hay problemas de eficacia asociados con el proceso: algunas mutaciones afectarán a la replicación del virus y algunas de las mutaciones pueden hacer que el virus esté demasiado atenuado. Las mutaciones también pueden ocurrir en el gen S, lo que también puede afectar a la inmunogenicidad, de modo que la respuesta inmunitaria deseada se vea afectada y la posible vacuna puede no proteger contra el serotipo necesario. Además, existen problemas asociados con la reversión a la virulencia y la estabilidad de las vacunas.

Menachery, V. D. *et al*. (2014) *J. Virol*., vol. 88, no. 8, 4251 - 4264, Los documentos WO 2005/049814 A2 y WO 2004/092360 ya desvelaron un coronavirus que comprende una mutación en nsp-15 y nsp-16, así como medios y métodos de cómo llegar a un coronavirus que comprende dichas proteínas estructurales mutadas.

Es importante que se desarrollen vacunas nuevas y más seguras para el control del IBV. Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas contra el IBV que no estén asociadas con estos problemas, en particular, vacunas que se pueden usar para la vacunación *in ovo*.

Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han usado un enfoque de genética inversa para atenuar racionalmente el IBV. Este enfoque es mucho más controlable que la atenuación aleatoria después de múltiples pasadas en los huevos embrionados, porque se conoce la posición de cada mutación y se puede deducir su efecto sobre el virus, es decir, el motivo de la atenuación.

Usando su enfoque de genética inversa, los presentes inventores han identificado diversas mutaciones que hacen que

el virus tenga niveles reducidos de patogenicidad. Los niveles de patogenicidad pueden reducirse de manera que cuando el virus se administra a un huevo embrionado, es capaz de replicarse sin ser patógeno para el embrión. Dichos virus pueden ser adecuados para la vacunación *in ovo*, lo que es una ventaja significativa y supone una mejora con respecto a las vacunas atenuadas contra el IBV producidas tras múltiples pasadas en huevos embrionados.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un coronavirus atenuado, vivo, que comprende una variante de gen de la replicasa codificante de poliproteínas que comprenden una mutación en nsp-14, en donde la variante del gen de la replicasa codifica una proteína que comprende una mutación de aminoácidos de Val a Leu en la posición correspondiente a la posición 393 de SEQ ID NO: 7.

La variante del gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de la lista de:

de Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6,
de Leu a lie en la posición 183 de SEQ ID NO: 8;
de Val a lie en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

El gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende la mutación de aminoácidos de Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6.

El gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos de Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7; de Leu a lie en la posición 183 de SEQ ID NO: 8; y de Val a lie en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

El gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende la mutaciones de aminoácidos de Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6; de Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7; de Leu a lie en la posición 183 de SEQ ID NO: 8; y de Val a lie en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

El gen de la replicasa puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos seleccionadas de la lista de:

de C a T en la posición de nucleótido 12137;
de G a C en la posición de nucleótido 18114;
de T a A en la posición de nucleótido 19047; y
de G a A en la posición de nucleótido 20139;
en comparación con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

El coronavirus puede ser un virus de la bronquitis infecciosa (IBV).

El coronavirus puede ser IBV M41.

El coronavirus puede comprender una proteína S, al menos parte de la cual sea de un serotipo del IBV distinto de M41.

Por ejemplo, la subunidad S1 o la proteína S completa pueden ser de un serotipo del IBV distinto de M41.

El coronavirus de acuerdo con el primer aspecto tiene una patogenicidad reducida en comparación con un coronavirus que exprese una replicasa de tipo silvestre correspondiente, de modo que cuando el virus se administra a un huevo embrionado, es capaz de replicarse sin ser patógeno para el embrión.

En un segundo aspecto, se proporciona una variante del gen de la replicasa como se define en las reivindicaciones.

En un tercer aspecto, se proporciona una proteína codificada por una variante de gen de replicasa de coronavirus como se define en las reivindicaciones.

En un cuarto aspecto, se proporciona un plásmido que comprende un gen de la replicasa como se define en las reivindicaciones.

En un quinto aspecto, se proporciona un método de creación del coronavirus como se define en las reivindicaciones que comprende las siguientes etapas:

(i) transfectar un plásmido de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención a una célula hospedadora;
(ii) infectar la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de una cepa de coronavirus con un gen de la replicasa;
(iii) permitir que se produzca una recombinación homóloga entre las secuencias del gen de la replicasa en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma del virus recombinante para producir un gen de la replicasa modificado; e

(iv) seleccionar el virus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado.

El virus recombinante puede ser un virus vaccinia.

El método también puede incluir la etapa:
(v) recuperar el coronavirus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).

Se proporciona una célula capaz de producir un coronavirus de acuerdo con el primer aspecto.

En otro aspecto, se proporciona una vacuna que comprende un coronavirus como se define en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto que comprende la etapa de administrar una vacuna de acuerdo con la invención al sujeto.

Otros aspectos de la invención proporcionan:

- la vacuna como se define en las reivindicaciones para su uso en la prevención de una enfermedad en un sujeto.

También se describe en el presente documento el uso de un coronavirus de acuerdo con el primer aspecto en la fabricación de una vacuna para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto.

La enfermedad puede ser bronquitis infecciosa (BI).

El método de administración de la vacuna puede seleccionarse del grupo que consiste en; administración de gotas oculares, administración intranasal, administración en agua potable, inyección posterior a la eclosión e inyección *in ovo*.

La vacunación puede ser mediante vacunación *in ovo*.

La presente invención también proporciona un método de producción de una vacuna como se define en las reivindicaciones que comprende la etapa de infectar una célula como se define en las reivindicaciones con un coronavirus como se define en las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

Figura 1 - Cinética de crecimiento de M41-R-6 y M41-R-12 en comparación con M41-CK (M41 EP4) en células CK

Figura 2 - Signos clínicos, tos metálica y respiración sibilante, asociados con M41-R-6 y M41-R-12 en comparación con M41-CK (M41 EP4) y Beau-R (Las barras muestran la simulación, Beau-R, M41-R 6, M41 - R 12, M41-CK EP4 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 3 - Actividad ciliar de los virus en anillos traqueales aislados de tráqueas tomadas de polluelos infectados. El 100 % de la actividad ciliar indica que no hay efecto producido por el virus; apatógeno, el 0 % de actividad indica la pérdida completa de la actividad ciliar, la ciliostasis completa, que indica que el virus es patógeno (las barras muestran la simulación, Beau-R, M41-R 6, M41-R 12, M41-CK EP4 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 4 - Signos clínicos, tos metálica, asociado con M41R-nsp10rep y M41R-nsp14,15,16rep en comparación con M41R-12 y M41-CK (M41 EP5) (Las barras muestran la simulación, M41-R12; M41 R-nsp10rep; M41 R-nsp14,15,16rep y M41-CK EP5 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 5 - Actividad ciliar de M41R-nsp10rep y M41R-nsp14,15,16rep en comparación con M41-R-12 y M41-CK en anillos traqueales aislados de tráqueas tomadas de polluelos infectados (las barras muestran la simulación; M41-R12; M41R-nsp10rep; M41R-nsp14,15,16rep y M41-CK EP5 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 6 - Signos clínicos, tos metálica, asociado con M41R-nsp10, 15rep, M41R-nsp10, 14, 15rep, M41R-nsp10, 14, 16rep, M41R-nsp10, 15, 16rep y M41-K en comparación con M41-CK (Las barras muestran la simulación, M41R-nsp10,15rep1; M41R-nsp10,14,16rep4; M41R-nsp10,15,16rep8; M41R-nsp10,14,15rep10; M41-K6 y M41-CK EP4 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 7 - Signos clínicos, respiración sibilante, asociado con M41R-nsp10, 15rep, M41R-nsp10, 14, 15rep, M41R-nsp10,14, 16rep, M41 R-nsp1 0, 15, 16rep y M41-K en comparación con M41-CK (Las barras muestran la simulación, M41R-nsp10,15rep1; M41R-nsp10,14,16rep4; M41R-nsp10,15,16rep8; M41R-nsp10,14,15rep10;

M41-K6 y M41-CK EP4 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 8 - Actividad ciliar de M41R-nsp1 0, 15rep, M41 R-nsp1 0, 14, 15rep, M41R-nsp10, 14, 16rep, M41R-nsp10, 15, 16rep y M41-K en comparación con M41-CK en anillos traqueales aislados de tráqueas tomadas de polluelos infectados (las barras muestran la simulación, M41R-nsp10,15rep1; M41R-nsp10,14,16rep4; M41R-nsp10,15,16rep8; M41R-nsp10,14,15rep10; M41-K6 y M41-CK EP4 de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Figura 9 - Cinética del crecimiento de rIBV en comparación con M41-CK en células CK. La Fig. 9A muestra los resultados para M41-R y M41-K. La Fig. 9B muestra los resultados para M41-nsp10 rep; M41 R-nsp14, 15, 16 rep; M41 R-nsp1 0, 15 rep; M41 R-nsp10, 15, 16 rep; M41R-nsp10, 14, 15 rep; and M41R-nsp10, 14, 16.

Figura 10 - Posición de las mutaciones de aminoácidos en las secuencias mutadas de nsp10, nsp14, nsp15 y nsp16.

Figura 11 - A) Tos metálica; B) Síntomas respiratorios (respiración sibilante y estertores combinados) y C) Actividad ciliar de rIBV M41R-nsp10,14 rep y rIBV M41R-nsp10,16 rep en comparación con M41-CK (Las barras muestran la simulación, M41R-nsp10,14rep; M41R-nsp10,16rep y M41-K de izquierda a derecha de cada punto de tiempo).

Descripción detallada

La presente invención proporciona un coronavirus que comprende una variante del gen de la replicasa que, cuando se expresa en el coronavirus, hace que el virus tenga una patogenicidad reducida en comparación con un coronavirus correspondiente que comprende el gen de la replicasa de tipo silvestre.

CORONAVIRUS

Gammacoronavirus es un género de virus animales que pertenece a la familia *Coronaviridae*. Los coronavirus son virus con envoltura que tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y una simetría helicoidal.

El tamaño genómico de los coronavirus varía de aproximadamente 27 a 32 kilobases, siendo el tamaño más largo de entre todos los virus de ARN conocidos.

Los coronavirus infectan principalmente el tracto respiratorio superior o el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves. Se conocen de cinco a seis cepas diferentes de coronavirus que infectan a los seres humanos. El coronavirus humano más publicado, el SARS-CoV, causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), tiene una patogenia única, porque causa infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, y también puede causar gastroenteritis. El coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) también causa una infección en el tracto respiratorio inferior en los seres humanos. Se cree que los coronavirus causan un porcentaje significativo de todos los resfriados comunes en adultos humanos.

Los coronavirus también causan una variedad de enfermedades en animales de ganado y mascotas, algunas de las cuales pueden ser graves y suponen una amenaza para la industria agrícola. Los coronavirus económicamente significativos de animales de ganado incluyen el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), que causa principalmente enfermedades respiratorias en pollos y que afecta gravemente a la industria avícola en todo el mundo; el coronavirus porcino (gastroenteritis transmisible, TGE) y el coronavirus bovino, que provocan diarrea en animales jóvenes. El coronavirus felino tiene dos formas, el coronavirus entérico felino es un patógeno de menor importancia clínica, pero la mutación espontánea de este virus puede provocar peritonitis infecciosa felina (FIP), una enfermedad asociada con una alta mortalidad.

También hay dos tipos de coronavirus canino (CCoV), uno que causa la enfermedad gastrointestinal leve, y uno que ha resultado ser causante de la enfermedad respiratoria. El virus de la hepatitis de ratón (MHV) es un coronavirus que causa una enfermedad epidémica murina con una alta mortalidad, en especial, entre colonias de ratones de laboratorio.

Los coronavirus se dividen en cuatro grupos, como se muestra a continuación:

Alfa

- Coronavirus canino (CCoV)
- Coronavirus felino (FeCoV)
- Coronavirus humano 229E (HCoV-229E)
- Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)
- Virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV)
- Coronavirus humano NL63 (NL o New Haven)

Beta

- Coronavirus bovino (BCoV)
- Coronavirus respiratorio canino (CRCoV): común en el sudeste asiático y en Micronesia
- Coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43)
- Virus de la hepatitis de ratón (MHV)
- Virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (HEV)
- Coronavirus de rata (RCV). El coronavirus de rata es bastante frecuente en el este de Australia, donde, en marzo/abril de 2008, se ha encontrado entre colonias de roedores nativos y salvajes.
- (Sin nombre común hasta el momento) (HCoV-HKU1)
  Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)
- Coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV)

Gamma

- Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)
- Coronavirus de Turquía (virus de la enfermedad de Bluecomb)
- Coronavirus del faisán
- Coronavirus de la pintada

Delta

- Coronavirus del bulbul (BuCoV)
- Coronavirus del tordo (ThCoV)
- Coronavirus de Lonchura (MuCoV)
- Coronavirus porcino (PorCov) HKU15

La variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede derivarse de un alfacoronavirus tal como TGEV; un betacoronavirus tal como MHV; o un gammacoronavirus tal como IBV.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" significa que el gen de la replicasa comprende esencialmente la misma secuencia de nucleótidos que el gen de la replicasa de tipo silvestre del coronavirus relevante. Por ejemplo, la variante del gen de la replicasa de la presente invención puede tener hasta un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de replicasa de tipo silvestre. La variante del gen de la replicasa de coronavirus codifica una proteína que comprende una mutación en una o más proteínas no estructurales (nsp)-10, nsp-14, nsp-15 o nsp-16 en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína no estructural.

IBV

La bronquitis infecciosa aviar (BI) es una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa de los pollos causante de importantes pérdidas económicas. La enfermedad se caracteriza por signos respiratorios que incluyen jadeos, tos, estornudos, estertores traqueales y secreción nasal. En los pollos jóvenes, se puede presentar dificultad respiratoria grave. En las capas, la dificultad respiratoria, la nefritis, la disminución de la producción de huevos, y la pérdida de calidad interna del huevo y de calidad de la cáscara del huevo son comunes.

En los pollos de engorde, la tos y el traqueteo son signos clínicos comunes, extendiéndose rápidamente a todas las aves de la instalación. La morbilidad es del 100 % en los conjuntos de aves sin vacunar. La mortalidad varía según la edad, la cepa del virus y las infecciones secundarias, pero puede ser de hasta el 60 % en los conjuntos de aves sin vacunar.

El primer serotipo de IBV que se identificó fue Massachusetts, pero, en Estados Unidos, varios serotipos, incluyendo Arkansas y Delaware, se encuentran actualmente en circulación, además del tipo de Massachusetts identificado originalmente.

La cepa del IBV Beaudette se obtuvo después de al menos 150 pasadas en embriones de polluelo. El IBV Beaudette ya no es patógeno para las pollos eclosionados, pero mata rápidamente a los embriones.

H120 es una cepa comercial de vacuna atenuada viva del serotipo de IBV Massachusetts, atenuada mediante aproximadamente 120 pasadas en huevos de pollo embrionados. H52 es otra vacuna de Massachusetts, y representa un virus de una pasada anterior y ligeramente más patógeno (pasada 52) durante el desarrollo de H120. Las vacunas a base de H120 se usan comúnmente.

BI QX es un aislado de campo virulento del IBV. A veces se le conoce como "QX chino", ya que se aisló originalmente después de brotes de la enfermedad en la región china de Qingdao a mediados de la década de los 90 del siglo pasado. Desde entonces, el virus se ha extendido hacia Europa. Desde 2004, se han identificado problemas graves de producción de huevos con un virus muy similar en partes de Europa occidental, predominantemente en los Países

Bajos, pero también se ha informado de casos producidos en Alemania, Francia, Bélgica, Dinamarca y Reino Unido.

El Instituto de Investigación holandés de Deventer identificó el virus aislado de los casos holandeses como una nueva cepa que denominaron D388. La conexión con China provino de otras pruebas que mostraron que el virus era un 99 % similar a los virus QX chinos. Ahora se ha desarrollado una cepa de vacuna viva atenuada del IBV de tipo QX.

El IBV es un virus con envoltura que se replica en el citoplasma celular y que contiene un genoma de ARN de sentido positivo no segmentado, monocatenario. El IBV tiene un genoma de ARN de 27,6 kb y, como todos los coronavirus, contiene las cuatro proteínas estructurales; Glicoproteína pico (S), proteína de membrana pequeña (E), proteína de membrana integral (M) y proteína de nucleocápside (N) que interactúa con el ARN genómico.

El genoma se organiza de la siguiente manera: UTR de 5' - gen de la polimerasa (replicasa) - genes de proteínas estructurales (S-E-M-N) - UTR de 3'; donde la UTR son regiones no traducidas (cada ~500 nucleótidos en IBV).

La envoltura lipídica contiene tres proteínas de membrana: S, M y E. La proteína S del IBV es una glicoproteína de tipo I que se oligomeriza en el retículo endoplasmático y se ensambla en un homotrímero insertado en la membrana del virión a través del dominio transmembrana y se asocia a través de interacciones no covalentes con la proteína M. Tras la incorporación a partículas de coronavirus, la proteína S es responsable de la unión al receptor de la célula diana y la fusión de las membranas víricas y celulares. La glicoproteína S consiste en cuatro dominios: una secuencia señal que se escinde durante la síntesis; el ectodominio, que está presente en el exterior de la partícula de virión; la región transmembrana responsable de anclar la proteína S en la bicapa lipídica de la partícula de virión; y la cola citoplasmática.

Todos los coronavirus también codifican un conjunto de genes proteicos auxiliares de función desconocida que no son necesarios para la replicación *in vitro,* pero pueden desempeñar un papel en la patogénesis. El IBV codifica dos genes auxiliares, genes 3 y 5, ambos expresan dos proteínas auxiliares 3a, 3b y 5a, 5b, respectivamente.

la variante del gen de replicasa del coronavirus de la presente invención puede derivarse de un IBV. Por ejemplo, el IBV puede ser IBV Beaudette, H120, H52, IB QX, D388 o M41.

El IBV puede ser IBV M41. M41 es un serotipo Massachusetts prototipo que se aisló en EE.UU. en 1941. Es un aislado usado en muchos laboratorios de todo el mundo como una mancha de laboratorio patógena y se puede obtener de ATCC (VR-21™). Varios productores de vacunas también usan variantes atenuadas como vacunas de IBV contra serotipos Massachusetts que causan problemas en el campo. Los presentes inventores escogieron usar esta cepa, ya que habían trabajado durante muchos años en este virus, y porque se dispone de la secuencia completa del genoma del virus. El aislado de M41, M41-CK, usado por los presentes inventores se adaptó para crecer en células primarias de riñón de pollo (CK) y, por lo tanto, se consideró susceptible de recuperarse como un virus infeccioso de un ADNc del genoma completo. Es representativo de un IBV patógeno y, por lo tanto, puede analizarse en busca de mutaciones que causen la pérdida o reducción de la patogenicidad.

La secuencia genómica del IBV M41-CK se proporciona como SEQ ID NO: 1.
<u>SEQ ID NO: 1 Secuencia del IBV M41-CK</u>

```
ACTTAAGATAGATATTAATATATATCTATCACACTAGCCTTGCGCTAGATTTCCAACTTA
ACAAAACGGACTTAAATACCTACAGCTGGTCCTCATAGGTGTTCCATTGCAGTGCACTTT
AGTGCCCTGGATGGCACCTGGCCACCTGTCAGGTTTTTGTTATTAAAATCTTATTGTTGC
TGGTATCACTGCTTGTTTTGCCGTGTCTCACTTTATACATCCGTTGCTTGGGCTACCTAG
TATCCAGCGTCCTACGGGCGCCGTGGCTGGTTCGAGTGCGAAGAACCTCTGGTTCATCTA
GCGGTAGGCGGGTGTGTGGAAGTAGCACTTCAGACGTACCGGTTCTGTTGTGTGAAATAC
GGGGTCACCTCCCCCCACATACCTCTAAGGGCTTTTGAGCCTAGCGTTGGGCTACGTTCT
CGCATAAGGTCGGCTATACGACGTTTGTAGGGGGTAGTGCCAAACAACCCCTGAGGTGAC
AGGTTCTGGTGGTGTTTAGTGAGCAGACATACAATAGACAGTGACAACATGGCTTCAAGC
CTAAAACAGGGAGTATCTCCCAAACTAAGGGATGTCATTCTTGTATCCAAAGACATTCCT
GAACAACTTTGTGACGCTTTGTTTTTCTATACGTCACACAACCCTAAGGATTACGCTGAT
GCTTTTGCAGTTAGGCAGAAGTTTGATCGTAATCTGCAGACTGGGAAACAGTTCAAATTT
GAAACTGTGTGTGGTCTCTTCCTCTTGAAGGGAGTTGACAAAATAACACCTGGCGTCCCA
GCAAAAGTCTTAAAAGCCACTTCTAAGTTGGCAGATTTAGAAGACATCTTTGGTGTCTCT
```

CCCTTTGCAAGAAAATATCGTGAACTTTTGAAGACAGCATGCCAGTGGTCTCTTACTGTA
GAAACACTGGATGCTCGTGCACAAACTCTTGATGAAATTTTTGACCCTACTGAAATACTT
TGGCTTCAGGTGGCAGCAAAAATCCAAGTTTCGGCTATGGCGATGCGCAGGCTTGTTGGA
GAAGTAACTGCAAAAGTCATGGATGCTTTGGGCTCAAATATGAGTGCTCTTTTCCAGATT
TTTAAACAACAAATAGTCAGAATTTTTCAAAAAGCGCTGGCTATTTTTGAGAATGTGAGT
GAATTACCACAGCGTATTGCAGCACTTAAGATGGCTTTTGCTAAGTGTGCCAAGTCCATT
ACTGTTGTGGTTATGGAGAGGACTCTAGTTGTTAGAGAGTTCGCAGGAACTTGTCTTGCA
AGCATTAATGGTGCTGTTGCAAAATTCTTTGAAGAACTCCCAAATGGTTTCATGGGTGCT
AAAATTTTCACTACACTTGCCTTCTTTAGGGAGGCTGCAGTGAAAATTGTGGATAACATA
CCAAATGCACCGAGAGGCACTAAAGGGTTTGAAGTCGTTGGTAATGCCAAAGGTACACAA
GTTGTTGTGCGTGGCATGCGAAATGACTTAACACTGCTTGACCAAAAAGCTGAAATTCCT
GTGGAGTCAGAAGGTTGGTCTGCAATTTTGGGTGGACATCTTTGCTATGTCTTTAAGAGT
GGTGATCGCTTTTACGCGGCACCTCTTTCAGGAAATTTTGCATTGCATGATGTGCATTGT
TGTGAGCGTGTTGTCTGTCTTTCTGATGGTGTAACACCGGAGATAAATGATGGACTTATT
CTTGCAGCAATCTACTCTTCTTTTAGTGTCGCAGAACTTGTGGCAGCCATTAAAAGGGGT
GAACCATTTAAGTTTCTGGGTCATAAATTTGTGTATGCAAAGGATGCAGCAGTTTCTTTT
ACATTAGCGAAGGCTGCTACTATTGCAGATGTTTTGAAGCTGTTTCAATCAGCGCGTGTG
AAAGTAGAAGATGTTTGGTCTTCACTTACTGAAAAGTCTTTTGAATTCTGGAGGCTTGCA
TATGGAAAAGTGCGTAATCTCGAAGAATTTGTTAAGACTTGTTTTTGTAAGGCTCAAATG
GCGATTGTGATTTTAGCGACAGTGCTTGGAGAGGGCATTTGGCATCTTGTTTCGCAAGTC
ATCTATAAAGTAGGTGGTCTTTTTACTAAAGTTGTTGACTTTTGTGAAAAATATTGGAAA
GGTTTTTGTGCACAGTTGAAAAGAGCTAAGCTCATTGTCACTGAAACCCTCTGTGTTTTG
AAAGGAGTTGCACAGCATTGTTTTCAACTATTGCTGGATGCAATACAGTTTATGTATAAA
AGTTTTAAGAAGTGTGCACTTGGTAGAATCCATGGAGACTTGCTCTTCTGGAAAGGAGGT
GTGCACAAAATTATTCAAGAGGGCGATGAAATTTGGTTTGACGCCATTGATAGTATTGAT
GTTGAAGATCTGGGTGTTGTTCAAGAAAAATTGATTGATTTTGATGTTTGTGATAATGTG
ACACTTCCAGAGAACCAACCCGGTCATATGGTTCAAATCGAGGATGACGGAAAGAACTAC
ATGTTCTTCCGCTTCAAAAAGGATGAGAACATTTATTATACACCAATGTCACAGCTTGGT
GCTATTAATGTGGTTTGCAAAGCAGGCGGTAAAACTGTCACCTTTGGAGAAACTACTGTG
CAAGAAATACCACCACCTGATGTTGTGTTTATTAAGGTTAGCATTGAGTGTTGTGGTGAA
CCATGGAATACAATCTTCAAAAAGGCTTATAAGGAGCCCATTGAAGTAGAGACAGACCTC
ACAGTTGAACAATTGCTCTCTGTGGTCTATGAGAAAATGTGTGATGATCTCAAGCTGTTT
CCGGAGGCTCCAGAACCACCACCATTTGAGAATGTCACACTTGTTGATAAGAATGGTAAA
GATTTGGATTGCATAAAATCATGCCATCTGATCTATCGTGATTATGAGAGCGATGATGAC
ATCGAGGAAGAAGATGCAGAAGAATGTGACACGGATTCAGGTGATGCTGAGGAGTGTGAC
ACTAATTCAGAATGTGAAGAAGAAGATGAGGATACTAAAGTGTTGGCTCTTATACAAGAC
CCGGCAAGTAACAAATATCCTCTGCCTCTTGATGATGATTATAGCGTCTACAATGGATGT
ATTGTTCATAAGGACGCTCTCGATGTTGTGAATTTACCATCTGGTGAAGAAACCTTTGTT
GTCAATAACTGCTTTGAAGGGGCTGTTAAAGCTCTTCCGCAGAAAGTTATTGATGTTCTA
GGTGACTGGGGTGAGGCTGTTGATGCGCAAGAACAATTGTGTCAACAAGAATCAACTCGG
GTCATATCTGAGAAATCAGTTGAGGGTTTTACTGGTAGTTGTGATGCAATGGCTGAACAA
GCTATTGTTGAAGAGCAGGAAATAGTACCTGTTGTTGAACAAAGTCAGGATGTAGTTGTT
TTTACACCTGCAGACCTAGAAGTTGTTAAAGAAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTTATT
CTCATTTCTGCTGTCCCTAAAGAAGAAGTTGTGTCTCAGGAGAAAGAGGAGCCACAGGTT
GAGCAAGAGCCTACCCTAGTTGTTAAAGCACAACGTGAGAAGAAGGCTAAAAAGTTCAAA
GTTAAACCAGCTACATGTGAAAAACCCAAATTTTTGGAGTACAAAACATGTGTGGGTGAT
TTGGCTGTTGTAATTGCCAAAGCATTGGATGAGTTTAAAGAGTTCTGCATTGTAAACGCT
GCAAATGAGCACATGTCGCATGGTGGTGGCGTTGCAAAGGCAATTGCAGACTTTTGTGGA
CCGGACTTTGTTGAATATTGCGCGGACTATGTTAAGAAACATGGTCCACAGCAAAAACTT
GTCACACCTTCATTTGTTAAAGGCATTCAATGTGTGAATAATGTTGTAGGACCTCGCCAT
GGAGACAGCAACTTGCGTGAGAAGCTTGTTGCTGCTTACAAGAGTGTTCTTGTAGGTGGA
GTGGTTAACTATGTTGTGCCAGTTCTCTCATCAGGGATTTTTGGTGTAGATTTTAAAATA
TCAATAGATGCTATGCGCGAAGCTTTTAAAGGTTGTGCCATACGCGTTCTTTTATTTTCT
CTGAGTCAAGAACACATCGATTATTTCGATGCAACTTGTAAGCAGAAGACAATTTATCTT
ACGGAGGATGGTGTTAAATACCGCTCTGTTGTTTTAAAACCTGGTGATTCTTTGGGTCAA
TTTGGACAGGTTTTTGCAAGAAATAAGGTAGTCTTTTCGGCTGATGATGTTGAGGATAAA
GAAATCCTCTTTATACCCACAACTGACAAGACTATTCTTGAATATTATGGTTTAGATGCG

CAAAAGTATGTAACATATTTGCAAACGCTTGCGCAGAAATGGGATGTTCAATATAGAGAC
AATTTTGTTATATTAGAGTGGCGTGACGGAAATTGCTGGATTAGTTCAGCAATAGTTCTC
CTTCAAGCTGCTAAAATTAGATTTAAAGGTTTTCTTGCAGAAGCATGGGCTAAACTGTTG
GGTGGAGATCCTACAGACTTTGTTGCCTGGTGTTATGCAAGTTGCAATGCTAAAGTAGGT
GATTTTTCAGATGCTAATTGGCTTTTGGCCAATTTAGCAGAACATTTTGACGCAGATTAC
ACAAATGCACTTCTTAAGAAGTGTGTGTCGTGCAATTGTGGTGTTAAGAGTTATGAACTT
AGGGGTCTTGAAGCCTGTATTCAGCCAGTTCGAGCACCTAATCTTCTACATTTTAAAACG
CAATATTCAAATTGCCCAACCTGTGGTGCAAGTAGTACGGATGAAGTAATAGAAGCTTCA
TTACCGTACTTATTGCTTTTTGCTACTGATGGTCCTGCTACAGTTGATTGTGATGAAAAT
GCTGTAGGGACTGTTGTTTTCATTGGCTCTACTAATAGTGGCCATTGTTATACACAAGCC
GATGGTAAGGCTTTTGACAATCTTGCTAAGGATAGAAAATTTGGAAGGAAGTCGCCTTAC
ATTACAGCAATGTATACACGTTTTTCTCTTAGGAGTGAAAATCCCCTACTTGTTGTTGAA
CATAGTAAGGGTAAAGCTAAAGTAGTAAAAGAAGATGTTTCTAACCTTGCTACTAGTTCT
AAAGCCAGTTTTGACGATCTTACTGACTTTGAACAGTGGTATGATAGCAACATCTATGAG
AGTCTTAAAGTGCAGGAGACACCTGATAATCTTGATGAATATGTGTCATTTACGACAAAG
GAAGATTCTAAGTTGCCACTGACACTTAAAGTTAGAGGTATCAAATCAGTTGTTGACTTT
AGGTCTAAGGATGGTTTTACTTATAAGTTAACACCTGATACTGATGAAAATTCAAAAACA
CCAGTCTACTACCCAGTCTTGGATTCTATTAGTCTTAGGGCAATATGGGTTGAAGGCAGT
GCTAATTTTGTTGTTGGGCATCCAAATTATTATAGTAAGTCTCTCCGAATTCCCACGTTT
TGGGAAAATGCCGAGAGCTTTGTTAAAATGGGTTATAAAATTGATGGTGTAACTATGGGC
CTTTGGCGTGCAGAACACCTTAATAAACCTAATTTGGAGAGAATTTTTAACATTGCTAAG
AAAGCTATTGTTGGATCTAGTGTTGTTACTACGCAGTGTGGTAAAATACTAGTTAAAGCA
GCTACATACGTTGCCGATAAAGTAGGTGATGGTGTAGTTCGCAATATTACAGATAGAATT
AAGGGTCTTTGTGGATTCACACGTGGCCATTTTGAAAAGAAAATGTCCCTACAATTTCTA
AAGACACTTGTGTTCTTTTTCTTTTATTTCTTAAAGGCTAGTGCTAAGAGTTTAGTTTCT
AGCTATAAGATTGTGTTATGTAAGGTGGTGTTTGCTACCTTACTTATAGTGTGGTTTATA
TACACAAGTAATCCAGTAGTGTTTACTGGAATACGTGTGCTAGACTTCCTATTTGAAGGT
TCTTTATGTGGTCCTTATAATGACTACGGTAAAGATTCTTTTGATGTGTTACGCTATTGT
GCAGGTGATTTTACTTGTCGTGTGTGTTTACATGATAGAGATTCACTTCATCTGTACAAA
CATGCTTATAGCGTAGAACAAATTTATAAGGATGCAGCTTCTGGCATTAACTTTAATTGG
AATTGGCTTTATTTGGTCTTTCTAATATTATTTGTTAAGCCAGTGGCAGGTTTTGTTATT
ATTTGTTATTGTGTTAAGTATTTGGTATTGAGTTCAACTGTGTTGCAAACTGGTGTAGGT
TTTCTAGATTGGTTTGTAAAAACAGTTTTTACCCATTTTAATTTTATGGGAGCGGGATTT
TATTTCTGGCTCTTTTACAAGATATACGTACAAGTGCATCATATATTGTACTGTAAGGAT
GTAACATGTGAAGTGTGCAAGAGAGTTGCACGCAGCAACAGGCAAGAGGTTAGCGTTGTA
GTTGGTGGACGCAAGCAAATAGTGCATGTTTACACTAATTCTGGCTATAACTTTTGTAAG
AGACATAATTGGTATTGTAGAAATTGTGATGATTATGGTCACCAAAATACATTTATGTCC
CCTGAAGTTGCTGGCGAGCTTTCTGAAAAGCTTAAGCGCCATGTTAAACCTACAGCATAT
GCTTACCACGTTGTGTATGAGGCATGCGTGGTTGATGATTTTGTTAATTTAAAATATAAG
GCTGCAATTCCTGGTAAGGATAATGCATCTTCTGCTGTTAAGTGTTTCAGTGTTACAGAT
TTTTTAAAGAAAGCTGTTTTTCTTAAGGAGGCATTGAAATGTGAACAAATATCTAATGAT
GGTTTTATAGTGTGTAATACACAGAGTGCGCATGCACTAGAGGAAGCAAAGAATGCAGCC
GTCTATTATGCGCAATATCTGTGTAAGCCAATACTTATACTTGACCAGGCACTTTATGAG
CAATTAATAGTAGAGCCTGTGTCTAAGAGTGTTATAGATAAAGTGTGTAGCATTTTGTCT
AATATAATATCTGTAGATACTGCAGCTTTAAATTATAAGGCAGGCACACTTCGTGATGCT
CTGCTTTCTATTACTAAAGACGAAGAAGCCGTAGATATGGCTATCTTCTGCCACAATCAT
GAAGTGGAATACACTGGTGACGGTTTTACTAATGTGATACCGTCATATGGTATGGACACT
GATAAGTTGACACCTCGTGATAGAGGGTTTTTGATAAATGCAGATGCTTCTATTGCTAAT
TTAAGAGTCAAAAATGCTCCTCCGGTAGTATGGAAGTTTTCTGATCTTATTAAATTGTCT
GACAGTTGCCTTAAATATTTAATTTCAGCTACTGTCAAGTCAGGAGGTCGTTTCTTTATA
ACAAAGTCTGGTGCTAAACAAGTTATTTCTTGTCATACCCAGAAACTGTTGGTAGAGAAA
AAGGCAGGTGGTGTTATTAATAACACTTTTAAATGGTTTATGAGTTGTTTTAAATGGCTT
TTTGTCTTTTATATACTTTTTACAGCATGTTGTTTGGGTTACTACTATATGGAGATGAAT
AAAAGTTTTGTTCACCCCATGTATGATGTAAACTCCACACTGCATGTTGAAGGGTTCAAA
GTTATAGACAAAGGTGTTATTAGAGAGATTGTGTCAGAAGATAATTGTTTCTCTAATAAG
TTTGTTAATTTTGACGCCTTTTGGGGTAAATCATATGAAAATAATAAAAACTGTCCAATT
GTTACAGTTGTTATAGATGGTGACGGGACAGTAGCTGTTGGTGTTCCTGGTTTTGTATCA

TGGGTTATGGATGGTGTTATGTTTGTGCATATGACACAGACTGATCGTAGACCTTGGTAC
ATTCCTACCTGGTTTAATAGAGAAATTGTTGGTTACACTCAGGATTCAATTATCACTGAG
GGTAGTTTTTATACATCTATAGCATTATTTTCTGCTAGATGTTTATATTTAACAGCCAGC
AATACACCTCAATTGTATTGTTTTAATGGCGACAATGATGCACCTGGAGCCTTACCATTT
GGTAGTATTATTCCTCATAGAGTATACTTCCAACCTAATGGTGTTAGGCTTATAGTTCCA
CAACAAATACTGCATACACCCTACATAGTGAAGTTTGTTTCAGACAGCTATTGTAGAGGT
AGTGTATGTGAGTATACTAAACCAGGTTACTGTGTGTCACTAGACTCCCAATGGGTTTTG
TTTAATGATGAATACATTAGTAAACCTGGCGTTTTCTGTGGTTCTACTGTTAGAGAACTT
ATGTTTAATATGGTTAGTACATTCTTTACTGGTGTCAACCCTAATATTTATATTCAGCTA
GCAACTATGTTTTTAATACTAGTTGTTATTGTGTTAATTTTTGCAATGGTTATAAAGTTT
CAAGGTGTTTTTAAAGCTTATGCGACCATTGTGTTTACAATAATGTTAGTTTGGGTTATT
AATGCATTTGTTTTGTGTGTACATAGTTATAATAGTGTTTTAGCTGTTATATTATTAGTA
CTCTATTGCTATGCATCATTGGTTACAAGTCGCAATACTGCTATAATAATGCATTGTTGG
CTTGTTTTTACCTTTGGTTTAATAGTACCCACATGGTTGGCTTGTTGCTATCTGGGATTT
ATTCTTTATATGTACACACCGTTGGTTTTCTGGTGTTACGGTACTACTAAAAATACTCGT
AAGTTGTATGATGGCAACGAGTTTGTTGGTAATTATGACCTTGCTGCGAAGAGCACTTTT
GTTATTCGTGGTACTGAATTTGTTAAGCTTACGAATGAGATAGGTGATAAATTTGAAGCC
TATCTTTCTGCGTATGCTAGACTTAAATACTATTCAGGCACTGGTAGTGAGCAAGATTAC
TTGCAAGCTTGTCGTGCATGGTTAGCTTATGCTTTGGACCAATATAGAAATAGTGGTGTT
GAGGTTGTTTATACCCCACCGCGTTACTCTATTGGTGTTAGTAGACTACACGCTGGTTTT
AAAAAACTAGTTTCTCCTAGTAGTGCTGTTGAGAAGTGCATTGTTAGTGTCTCTTATAGA
GGCAATAATCTTAATGGACTGTGGCTGGGTGATTCTATTTACTGCCCACGCCATGTGTTA
GGTAAGTTTAGTGGTGACCAGTGGGGTGACGTACTAAACCTTGCTAATAATCATGAGTTT
GAAGTTGTAACTCAAAATGGTGTTACTTTGAATGTTGTCAGCAGGCGGCTTAAAGGAGCA
GTTTTAATTTTACAAACTGCAGTTGCCAATGCTGAAACTCCTAAGTATAAGTTTGTTAAA
GCTAATTGTGGTGATAGTTTCACTATAGCTTGTTCTTATGGTGGTACAGTTATAGGACTT
TACCCTGTCACTATGCGTTCTAATGGTACTATTAGAGCATCTTTCCTAGCAGGAGCCTGT
GGCTCAGTTGGTTTTAATATAGAAAAGGGTGTAGTTAATTTCTTTTATATGCACCATCTT
GAGTTACCTAATGCATTACACACTGGAACTGACCTAATGGGTGAGTTTTATGGTGGTTAT
GTAGATGAAGAGGTTGCGCAAAGAGTGCCACCAGATAATCTAGTTACTAACAATATTGTA
GCATGGCTCTATGCGGCAATTATTAGTGTTAAAGAAAGTAGTTTTTCACAACCTAAATGG
TTGGAGAGTACTACTGTTTCTATTGAAGATTACAATAGGTGGGCTAGTGATAATGGTTTT
ACTCCATTTTCCACTAGTACTGCTATTACTAAATTAAGTGCTATAACTGGGGTTGATGTT
TGTAAACTCCTTCGCACTATTATGGTAAAAAGTGCTCAATGGGGTAGTGATCCCATTTTA
GGACAATATAATTTTGAAGACGAATTGACACCAGAATCTGTATTTAATCAAGTTGGTGGT
GTTAGGTTACAGTCTTCTTTTGTAAGAAAAGCTACATCTTGGTTTTGGAGTAGATGTGTA
TTAGCTTGCTTCTTGTTTGTGTTGTGTGCTATTGTCTTATTTACGGCAGTGCCACTTAAG
TTTTATGTACATGCAGCTGTTATTTTGTTGATGGCTGTGCTCTTTATTTCTTTTTACTGTT
AAACATGTTATGGCATACATGGACACTTTCCTATTGCCTACATTGATTACAGTTATTATT
GGAGTTTGTGCTGAAGTCCCTTTCATATACAATACTCTAATTAGTCAAGTTGTTATTTTC
TTAAGCCAATGGTATGATCCTGTAGTCTTTGATACTATGGTACCATGGATGTTATTGCCA
TTAGTGTTGTACACTGCTTTTAAGTGTGTACAAGGCTGCTATATGAATTCTTTCAATACT
TCTTTGTTAATGCTGTATCAGTTTATGAAGTTAGGTTTTGTTATTTACACCTCTTCAAAC
ACTCTTACTGCATATACAGAAGGTAATTGGGAGTTATTCTTTGAGTTGGTTCACACTATT
GTGTTGGCTAATGTTAGTAGTAATTCCTTAATTGGTTTAATTGTTTTTAAGTGTGCTAAG
TGGATTTTATATTATTGCAATGCAACATACTTTAATAATTATGTGTTAATGGCAGTCATG
GTTAATGGCATAGGCTGGCTTTGCACCTGTTACTTTGGATTGTATTGGTGGGTTAATAAA
GTTTTTGGTTTAACCTTAGGTAAATACAATTTTAAAGTTTCAGTAGATCAATATAGGTAT
ATGTGTTTGCATAAGGTAAATCCACCTAAAACTGTGTGGGAGGTCTTTACTACAAATATA
CTTATACAAGGAATTGGAGGCGATCGTGTGTTGCCTATAGCTACAGTGCAATCTAAATTG
AGTGATGTAAAGTGTACAACTGTTGTTTTAATGCAGCTTTTGACTAAGCTTAATGTTGAA
GCAAATTCAAAAATGCATGCTTATCTTGTTGAGTTACACAATAAAATCCTCGCATCTGAT
GATGTTGGAGAGTGCATGGATAATTTATTGGGTATGCTTATAACACTATTTTGTATAGAT
TCTACTATTGATTTGGGTGAGTATTGTGATGATATACTTAAGAGGTCAACTGTATTACAA
TCGGTTACTCAAGAGTTTTCGCACATACCCTCGTATGCTGAATATGAAAGAGCTAAGAGT
ATTTATGAAAAGGTTTTAGCCGATTCTAAAAATGGTGGTGTAACACAGCAAGAGCTTGCT
GCATATCGTAAAGCTGCCAATATTGCAAAGTCAGTTTTTGATAGAGACTTGGCTGTTCAA

AAGAAGTTAGATAGCATGGCAGAACGTGCTATGACAACAATGTATAAAGAGGCGCGTGTA
ACTGATAGAAGAGCAAAATTAGTTTCATCATTACATGCACTACTTTTTTCAATGCTTAAG
AAAATAGATTCTGAGAAGCTTAATGTCTTATTTGACCAGGCGAATAGTGGTGTTGTACCC
CTAGCAACTGTTCCAATTGTTTGTAGTAATAAGCTTACCCTTGTTATACCAGACCCAGAG
ACGTGGGTCAAGTGTGTGGAGGGTGTGCATGTTACATATTCAACAGTTGTTTGGAATATA
GACTGTGTTACTGATGCCGATGGCACAGAGTTACACCCCACTTCTACAGGTAGTGGATTG
ACTTACTGTATAAGTGGTGATAATATAGCATGGCCTTTAAAGGTTAACTTGACTAGGAAT
GGGCATAATAAGGTTGATGTTGCCTTGCAAAATAATGAGCTTATGCCTCACGGTGTAAAG
ACAAAGGCTTGCGTAGCAGGTGTAGATCAAGCACATTGTAGCGTTGAGTCTAAATGTTAT
TATACAAGTATTAGTGGCAGTTCAGTTGTAGCTGCTATTACCTCTTCAAATCCTAATCTG
AAAGTAGCCTCTTTTTTGAATGAGGCAGGTAATCAGATTTATGTAGACTTAGACCCACCA
TGTAAATTTGGTATGAAAGTGGGTGATAAGGTTGAAGTTGTTTACCTGTATTTTATAAAA
AATACGAGGTCTATTGTAAGAGGTATGGTACTTGGTGCTATATCTAATGTTGTTGTGTTA
CAATCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCT
TTTGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTA
GGTAACTGTGTTAAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAG
CCAAGTCCAACTCCGGATCAGGATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAGA
GCACATATAGCACACCCTGGCGGAGCAGGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGGT
TCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAAG
GTTTGCACTGTTTGTCAGTGTTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACAA
CCTAAACCTTCTGTTCAGTCAGTTGCTGTTGCATCTGGTTTTGATAAGAATTATTTAAAC
GGGTACGGGGTAGCAGTGAGGCTCGGCTGATACCCCTAGCTAATGGATGTGACCCCGATG
TTGTAAAGCGAGCCTTTGATGTTTGTAATAAGGAATCAGCCGGTATGTTTCAAAATTTGA
AGCGTAACTGTGCACGATTCCAAGAAGTACGTGATACTGAAGATGGAAATCTTGAGTATT
GTGATTCTTATTTTGTGGTTAAACAAACCACTCCTAGTAATTATGAACATGAGAAAGCTT
GTTATGAAGACTTAAAGTCAGAAGTAACAGCTGATCATGATTTCTTTGTGTTCAATAAGA
ACATTTATAATATTAGTAGGCAGAGGCTTACTAAGTATACTATGATGGATTTTTGCTATG
CTTTGCGGCACTTTGACCCAAAGGATTGCGAAGTTCTTAAAGAAATACTTGTCACTTATG
GTTGTATAGAAGATTATCACCCTAAGTGGTTTGAAGAGAATAAGGATTGGTACGACCCAA
TAGAAAACCCTAAATATTATGCCATGTTGGCTAAAATGGGACCTATTGTACGACGTGCTT
TATTGAATGCTATTGAGTTCGGAAACCTCATGGTTGAAAAAGGTTATGTTGGTGTTATTA
CACTTGATAACCAAGATCTTAATGGCAAATTTTATGATTTTGGTGATTTTCAGAAGACAG
CGCCTGGTGCTGGTGTTCCTGTTTTTGATACGTATTATTCTTACATGATGCCCATCATAG
CCATGACTGATGCGTTGGCACCTGAGAGGTATTTTGAATATGATGTGCATAAGGGTTATA
AATCTTATGATCTCCTCAAGTATGATTATACTGAGGAGAAACAAGATTTGTTTCAGAAGT
ACTTTAAGTATTGGGATCAAGAGTATCACCCTAACTGTCGCGACTGTAGTGATGACAGGT
GTTTGATACATTGTGCAAACTTCAACATCTTGTTTTCTACACTTGTACCGCAGACTTCTT
TCGGTAATTTGTGTAGAAAGGTTTTTGTTGATGGTGTACCATTTATAGCTACTTGTGGCT
ATCATTCTAAGGAACTTGGTGTTATTATGAATCAAGATAACACCATGTCATTTTCAAAAA
TGGGTTTGAGTCAACTCATGCAGTTTGTTGGAGATCCTGCCTTGTTAGTGGGGACATCCA
ATAAATTAGTGGATCTTAGAACGTCTTGTTTTAGTGTTTGTGCTTTAGCGTCTGGTATTA
CTCATCAAACGGTAAAACCAGGTCACTTTAACAAGGATTTCTACGATTTTGCAGAGAAGG
CTGGTATGTTTAAGGAAGGTTCTTCTATACCACTTAAACATTTCTTCTACCCACAGACTG
GTAATGCTGCTATAAACGATTATGATTATTATCGTTATAACAGGCCTACCATGTTTGATA
TACGTCAACTTTTATTTTGTTTAGAAGTGACTTCTAAATATTTTGAATGTTATGAAGGCG
GCTGTATACCAGCAAGCCAAGTTGTAGTTAACAATTTAGATAAGAGTGCAGGTTATCCGT
TCAATAAGTTTGGAAAGGCCCGTCTCTATTATGAAATGAGTCTAGAGGAGCAGGACCAAC
TCTTTGAGAGTACAAAGAAGAACGTCCTGCCTACTATAACTCAGATGAATTTAAAATATG
CCATATCCGCGAAAAATAGAGCGCGTACAGTGGCAGGTGTGTCTATCCTTTCTACTATGA
CTAATAGGCAGTTTCATCAGAAGATTCTTAAGTCTATAGTCAACACTAGAAACGCTCCTG
TAGTTATTGGAACAACCAAGTTTTATGGCGGTTGGGATAACATGTTGAGAAACCTTATTC
AGGGTGTTGAAGACCCGATTCTTATGGGTTGGGATTATCCAAAGTGTGATAGAGCAATGC
CTAATTTGTTGCGTATAGCAGCATCTTTAGTACTCGCTCGTAAACACACTAATTGTTGTA
CTTGGTCTGAACGCGTTTATAGGTTGTATAATGAATGCGCTCAGGTTTTATCTGAAACTG
TCTTAGCTACAGGTGGTATATATGTGAAACCTGGTGGTACTAGCAGTGGAGATGCTACTA
CTGCTTATGCAAACAGTGTTTTCAACATAATACAAGCCACATCTGCTAATGTTGCGCGTC
TTTTGAGTGTTATAACGCGTGATATTGTATATGATGACATTAAGAGCTTGCAGTATGAAT

TGTACCAGCAGGTTTATAGGCGAGTCAATTTTGACCCAGCATTTGTTGAAAAGTTTTATT
CTTATTTGTGTAAGAATTTCTCATTGATGATCTTGTCTGACGACGGTGTTGTTTGTTATA
ACAACACATTAGCCAAACAAGGTCTTGTAGCAGATATTTCTGGTTTTAGAGAAGTTCTCT
ACTATCAGAACAATGTTTTTATGGCTGATTCTAAATGTTGGGTTGAACCAGATTTAGAAA
AAGGCCCACATGAATTTTGTTCACAGCACACAATGTTAGTGGAGGTTGATGGTGAGCCTA
GATACTTGCCATATCCAGACCCATCACGTATTTTGTGTGCATGTGTTTTTGTAGATGATT
TGGATAAGACAGAATCTGTGGCTGTTATGGAGCGTTATATCGCTCTTGCCATAGATGCGT
ACCCACTAGTACATCATGAAAATGAGGAGTACAAGAAGGTATTCTTTGTGCTTCTTTCAT
ACATCAGAAAACTCTATCAAGAGCTTTCTCAGAATATGCTTATGGACTACTCTTTTGTAA
TGGATATAGATAAGGGTAGTAAATTTTGGGAACAGGAGTTCTATGAAAATATGTATAGAG
CCCCTACAACATTACAGTCTTGTGGCGTTTGTGTAGTGTGTAATAGTCAAACTATATTGC
GCTGTGGTAATTGTATTCGCAAACCATTTTTGTGTTGTAAGTGTTGCTATGACCATGTCA
TGCACACAGACCACAAAAATGTTTTGTCTATAAATCCTTACATTTGCTCACAGCCAGGTT
GTGGTGAAGCAGATGTTACTAAATTGTACCTCGGAGGTATGTCATACTTCTGCGGTAATC
ATAAACCAAAGTTATCAATACCGTTAGTATCTAATGGTACAGTGTTTGGAATTTACAGGG
CTAATTGTGCAGGTAGCGAAAATGTTGATGATTTTAATCAACTAGCTACTACTAATTGGT
CTACTGTGGAACCTTATATTTTGGCAAATCGTTGTGTAGATTCGTTGAGACGCTTTGCTG
CAGAGACAGTAAAAGCTACAGAAGAATTACATAAGCAACAATTTGCTAGTGCAGAAGTGA
GAGAAGTACTCTCAGATCGTGAATTGATTCTGTCTTGGGAGCCAGGTAAAACCAGGCCTC
CATTGAATAGAAATTATGTTTTCACTGGCTTTCACTTTACTAGAACTAGTAAAGTTCAGC
TCGGTGATTTTACATTTGAAAAAGGTGAAGGTAAGGACGTTGTCTATTATCGAGCGACGT
CTACTGCTAAATTGTCTGTTGGAGACATTTTTGTTTTAACCTCACACAATGTTGTTTCTC
TTATAGCGCCAACGTTGTGTCCTCAGCAAACCTTTTCTAGGTTTGTGAATTTAAGACCTA
ATGTGATGGTACCTGCGTGTTTTGTAAATAACATTCCATTGTACCATTTAGTAGGCAAGC
AGAAGCGTACTACAGTACAAGGCCCTCCTGGCAGTGGTAAATCCCATTTTGCTATAGGAT
TGGCGGCTTACTTTAGTAACGCCCGTGTCGTTTTTACTGCATGCTCTCATGCAGCTGTTG
ATGCTTTATGTGAAAAAGCTTTTAAGTTTCTTAAAGTAGATGATTGCACTCGTATAGTAC
CTCAAAGGACTACTATCGATTGCTTCTCTAAGTTTAAAGCTAATGACACAGGCAAAAAGT
ACATTTTTAGTACTATTAATGCCTTGCCAGAAGTTAGTTGTGACATTCTTTTGGTTGACG
AGGTTAGTATGTTGACCAATTACGAATTGTCTTTTATTAATGGTAAGATAAACTATCAAT
ATGTTGTGTATGTAGGTGATCCTGCTCAATTACCGGCGCCTCGTACGTTGCTTAACGGTT
CACTCTCTCCAAAGGATTATAATGTTGTCACAAACCTTATGGTTTGTGTTAAACCTGACA
TTTTCCTTGCAAAGTGTTACCGTTGTCCTAAAGAAATTGTAGATACTGTTTCTACTCTTG
TATATGATGGAAAGTTTATTGCAAATAACCCGGAATCACGTCAGTGTTTCAAGGTTATAG
TTAATAATGGTAATTCTGATGTAGGACATGAAAGTGGCTCAGCCTACAACATAACTCAAT
TAGAATTTGTGAAAGATTTTGTCTGTCGCAATAAGGAATGGCGGGAAGCAACATTCATTT
CACCTTATAATGCTATGAACCAGAGAGCCTACCGTATGCTTGGACTTAATGTTCAGACAG
TAGACTCGTCTCAAGGTTCGGAGTATGATTATGTTATCTTTTGTGTTACTGCAGATTCGC
AGCATGCACTGAATATTAACAGATTCAATGTAGCGCTTACAAGAGCCAAGCGTGGTATAC
TAGTTGTCATGCGTCAGCGTGATGAACTATATTCAGCTCTTAAGTTTATAGAGCTTGATA
GTGTAGCAAGTCTGCAAGGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTTAGTGGTG
TTCACCCAGCTTATGCAGTCACAACTAAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGTTAATGATG
AACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATTT
CTTTGTTAGGGTTTAAGATGAGTGTTAATGTTGAAGGCTGCCACAACATGTTTATAACAC
GTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATGTAGAAGCAACACATG
CTTGCGGTACTAACATTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCTCTACTGGTGCAG
ACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAATAATTTTGAGCCTG
TGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTATTCAAAAGTG
CTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCA
ACGTTTCAGATTGTGTAGTGTTTGTCACGTGGTGTCATGGCCTAGAACTAACCACTTTGC
GCTATTTTGTTAAAATAGGCAAGGACCAAGTTTGTTCTTGCGGTTCTAGAGCAACAACTT
TTAATTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTTGGAAGCATTGCTTGGGTTTTGATTTTGTTT
ATAATCCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGGTTATTCTGGTAACCTACAATTTAACC
ATGATTTGCATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGA
CGCGTTGTCTTGCAATTAATAATGCATTTTGTCAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACC
CTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTAGCTGTAGATATTTACAACGCATGTATC
TTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGCAACCCTAAAG

GTATAAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTAGATTCTATGATAAGAATCCAATAG
TACCCAATGTCAAGCAGTTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGCTGATG
GTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTAGTTTGTA
GGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTTAACCTACCTGGTTGTAATGGTGGTAGCTTGT
ATGTTAACAAGCATGCATTCCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTCGTAATTTGA
AAGCTATGCCATTCTTTTTCTATGACTCATCGCCTTGCGAGACCATTCAATTGGATGGAG
TTGCGCAAGACCTTGTGTCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCG
GTGCTGTTTGTAAAAAGCACGCACAAATGTATGCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAG
CTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTTACTAATAATTTTAACCCATATAATTTGTGGA
AAAGTTTTTCAGCTCTCCAGTCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTC
ATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATGCCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTTA
TAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTTTTTTTTAATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAG
CGTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAATATTCGCACACTGCCAAACAACCGTATTTTGAAAG
GTTTGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTACACGAACCAAACACCAC
TATACCGTAATACTGTTAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAATGGCCTAATAG
TGCTGTATGATGATAGATATGGTGATTACCAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTT
TAGTTTCTACACAGTGTTACAAGCGGTATTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTG
TTCAGAACGGTATTCCGTTAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTTAATG
GTGCGTTTGTTACGCTACCTAACACATTAAACACACAGGGTCGCAGTTATGAAACTTTTG
AACCTCGTAGTGATGTTGAGCGTGATTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAA
AGTATGGTAAAGAATTAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAAT
TAGGTGGTTTACACACTGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACG
CAAAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTCATGCAAAATTATTTTGTATTGGCAGACA
ATGGTTCCTACAAGCAAGTGTGTACTGTTGTGGATTTGCTGCTTGATGATTTCTTAGAAC
TTCTTAGGAACATACTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAA
TTGATTACCATAGCATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATTAAAACATGTT
ATCCACAGCTTCAATCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAGTTC
AGAATTGTGTTATGGAACCTTGCAACATTCCTAATTATGGTGTTGGAATAGCGTTGCCAA
GTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAGTATACACAACTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAA
CAATGTGTGTACCGCATAATATGCGAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAG
TGGCTCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAAGGGACACTCCTTGTCGATA
ATGATATTGTAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTCAGATTGCAATAAAT
ATAAGACAGAGCACAAGTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAA
AAAGAAAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTCATATATCTCT
CAAGTTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGA
CAAGTTGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTT
GTACAGCAGTGAATGCCTCTTCTTCAGAAGCATTCTTGGTTGGTGTTAATTATTTGGGTG
CAAGTGAAAAGGTTAAGGTTAGTGGAAAAACGCTGCACGCAAATTATATATTTTGGAGGA
ATTGTAATTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTGA
GATTGAAAGCAACACCAGTTGTTAATTTGAAAACTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTA
ATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTG
ACTCTTTTGTGTGTACTATGTAGTGCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTTTACTAC
TACCAAAGTGCCTTTAGACCACCTAATGGTTGGCATTTACACGGGGGTGCTTATGCGGTA
GTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCACCTGGGTGTATTGTTGGTACT
ATTCATGGTGGTCGTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGT
ATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGTACTGCACACTGTAACTTTTCAGATACTACAGTG
TTTGTTACACATTGTTATAAATATGATGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAAT
TTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTA
GCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTA
AATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTAT
TTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTAT
TTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTTA
GCATGCCAGTATAATACTGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTATTAATAGTAGT
TTAGTTAAGCAGAAGTTTATTGTCTATCGTGAAAATAGTGTTAATACTACTTTTACGTTA
CACAATTTCACTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCCTAATCCTAGTGGTGTTCAGAAT
ATTCAAACTTACCAAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAATTTTTCCTTT
CTGAGTAGTTTTGTTTATAAGGAGTCTAATTTTATGTATGGATCTTATCACCCAAGTTGT

AATTTTAGACTAGAAACTATTAATAATGGCTTGTGGTTTAATTCACTTTCAGTTTCAATT
GCTTACGGTCCTCTTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACTTGT
TGTTATGCTTATTCATATGGAGGTCCTTCGCTGTGTAAAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTA
GATCTTAATTTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATA
CAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTATAACTCGACACAATTATAATAATATTACTTTAAAT
ACTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAACTGGCCAAGGTTTTATTACTAATGTAACC
GACTCAGCTGTTAGTTATAATTATCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTAGATACATCT
GGTTCCATAGACATCTTTGTTGTACAAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTTAAC
CCTTGCGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGTAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTCTT
ACTTCACGTAATGAGACTGGTTCTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTTACATTAAAATCACT
AATGGAACACGTCGTTTTAGACGTTCTATTACTGAAAATGTTGCAAATTGCCCTTATGTT
AGTTATGGTAAGTTTTGTATAAAACCTGATGGTTCAATTGCCACAATAGTACCAAAACAA
TTGGAACAGTTTGTGGCACCTTTACTTAATGTTACTGAAAATGTGCTCATACCTAACAGT
TTTAATTTAACTGTTACAGATGAGTACATACAAACGCGTATGGATAAGGTCCAAATTAAT
TGTCTGCAGTATGTTTGTGGCAATTCTCTGGATTGTAGAGATTTGTTTCAACAATATGGG
CCTGTTTGTGACAACATATTGTCTGTAGTAAATAGTATTGGTCAAAAAGAAGATATGGAA
CTTTTGAATTTCTATTCTTCTACTAAACCGGCTGGTTTTAATACACCATTTCTTAGTAAT
GTTAGCACTGGTGAGTTTAATATTTCTCTTCTGTTAACAACTCCTAGTAGTCCTAGAAGG
CGTTCTTTTATTGAAGACCTTCTATTTACAAGCGTTGAATCTGTTGGATTACCAACAGAT
GACGCATACAAAAATTGCACTGCAGGACCTTTAGGTTTTCTTAAGGACCTTGCGTGTGCT
CGTGAATATAATGGTTTGCTTGTGTTGCCTCCCATTATAACAGCAGAAATGCAAATTTTG
TATACTAGTTCTCTAGTAGCTTCTATGGCTTTTGGTGGTATTACTGCAGCTGGTGCTATA
CCTTTTGCCACACAACTGCAGGCTAGAATTAATCACTTGGGTATTACCCAGTCACTTTTG
TTGAAGAATCAAGAAAAAATTGCTGCTTCCTTTAATAAGGCCATTGGTCGTATGCAGGAA
GGTTTTAGAAGTACATCTCTAGCATTACAACAAATTCAAGATGTTGTTAATAAGCAGAGT
GCTATTCTTACTGAGACTATGGCATCACTTAATAAAAATTTTGGTGCTATTTCTTCTATG
ATTCAAGAAATCTACCAGCAACTTGACGCCATACAAGCAAATGCTCAAGTGGATCGTCTT
ATAACTGGTAGATTGTCATCACTTTCTGTTTTAGCATCTGCTAAGCAGGCGGAGCATATT
AGAGTGTCACAACAGCGTGAGTTAGCTACTCAGAAAATTAATGAGTGTGTTAAGTCACAG
TCTATTAGGTACTCCTTTTGTGGTAATGGACGACATGTTCTAACCATACCGCAAAATGCA
CCTAATGGTATAGTGTTTATACACTTTTCTTATACTCCAGATAGTTTTGTTAATGTTACT
GCAATAGTGGGTTTTTGTGTAAAGCCAGCTAATGCTAGTCAGTATGCAATAGTACCCGCT
AATGGTAGGGGTATTTTTATACAAGTTAATGGTAGTTACTACATCACAGCACGAGATATG
TATATGCCAAGAGCTATTACTGCAGGAGATATAGTTACGCTTACTTCTTGTCAAGCAAAT
TATGTAAGTGTAAATAAGACCGTCATTACTACATTCGTAGACAATGATGATTTTGATTTT
AATGACGAATTGTCAAAATGGTGGAATGACACTAAGCATGAGCTACCAGACTTTGACAAA
TTCAATTACACAGTACCTATACTTGACATTGATAGTGAAATTGATCGTATTCAAGGCGTT
ATACAGGGTCTTAATGACTCTTTAATAGACCTTGAAAAACTTTCAATACTCAAAACTTAT
ATTAAGTGGCCTTGGTATGTGTGGTTAGCCATAGCTTTTGCCACTATTATCTTCATCTTA
ATACTAGGATGGGTTTTCTTCATGACTGGATGTTGTGGTTGTTGTTGTGGATGCTTTGGC
ATTATGCCTCTAATGAGTAAGTGTGGTAAGAAATCTTCTTATTACACGACTTTTGATAAC
GATGTGGTAACTTAACAATACAGACCTAAAAAGTCTGTTTAATGATTCAAAGTCCCACGT
CCTTCCTAATAGTATTAATTTTTCTTTGGTGTAAACTTGTACTAAGTTGTTTTAGAGAGT
TTATTATAGCGCTCCAACAACTAATACAAGTTTTACTCCAAATTATCAATAGTAACTTAC
AGCCTAGACTGACCCTTTGTCACAGTCTAGACTAATGTTAAACTTAGAAGCAATTATTGA
AACTGGTGAGCAAGTGATTCAAAAAATCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATT
AAACACAGAAGTATTTGACCCCTTTGACTATTGTTATTACAGAGGAGGTAATTTTTGGGA
AATAGAGTCAGCTGAAGATTGTTCAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGG
AAAATGGAAGTTTTCTAACAGCGCTTTATATATTTGTAGGATTTTTAGCACTTTATCTTC
TAGGTAGAGCACTTCAAGCATTTGTACAGGCTGCTGATGCTTGTTGTTTATTTTGGTATA
CATGGGTAGTAATTCCAGGAGCTAAGGGTACAGCCTTTGTATATAAGTATACATATGGTA
GAAAACTTAACAATCCGGAATTAGAAGCAGTTATTGTCAACGAGTTTCCTAAGAACGGTT
GGAATAATAAAAATCCAGCAAATTTTCAAGATGTCCAACGAGACAAATTGTACTCTTGAC
TTTGAACAGTCAGTTGAGCTTTTTAAAGAGTATAATTTATTTATAACTGCATTCTTGTTG
TTCTTAACCATAATACTTCAGTATGGCTATGCAACAAGAAGTAAGTTTATTTATATACTG
AAAATGATAGTGTTATGGTGCTTTTGGCCCCTTAACATTGCAGTAGGTGTAATTTCATGT
ATATACCCACCAAACACAGGAGGTCTTGTCGCAGCGATAATACTTACAGTGTTTGCGTGT

CTGTCTTTTGTAGGTTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTTAAGCGGTGTAGGTCATGG
TGGTCATTTAACCCAGAATCTAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAACAA
TGTAATTTTGCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGCTTTCTCCAATTATAAAGAATGGTGTT
CTTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTTGCTAAGTGTGAACCAGACCACTTGCCTAAAGATATA
TTTGTTTGTACACCGGATAGACGTAATATCTACCGTATGGTGCAGAAATATACTGGTGAC
CAAAGCGGAAATAAGAAACGGTTTGCTACGTTTGTCTATGCAAAGCAGTCAGTAGATACT
GGCGAGCTAGAAAGTGTAGCAACAGGAGGGAGTAGTCTTTACACCTAAATGTGTGTGTGT
AGAGAGTATTTAAAATTATTCTTTAATAGTGCCTCTATTTTAAGAGCGCATAATAGTATT
ATTTTTGAGGATATTAATATAAATCCTCTCTGTTTTATACTCTCTTTTCAAGAGCTATTA
TTTAAAAAACAGTTTTTCCACTCTTTTGTGCCAAAAACTATTGTTGTTAATGGTGTAACC
TTTCAAGTAGATAATGGAAAAGTCTACTACGAAGGAAAACCAATTTTTCAGAAAGGTTGT
TGTAGGTTGTGGTTGAGTTATAAAAAAGATTAAACTACCTACTACACTTATTTTTATAAG
AGGCGTTTTATCTTACAAGCGCTTAATAAATACGGACGATGAAATGGCTGACTAGTTTTG
TAAGGGCAGTTATTTCATGTTATAAACCCCTATTATTAACTCAATTAAGAGTATTAGATA
GGTTAATCTTAGATCATGGACCAAAACACATCTTAACGTGTGTTAGGTGCGTGATTTTGT
TTCAATTAGATTTAGTTTATAGGTTGGCGTATACGCCTACTCAATCGCTGGTATGAATAA
TAGTAAAGATAATCCTTTTTGCGGAGCAATAGCAAGAAAAGCGCGAATTTATCTGAGAGA
AGGATTAGATTGTGTTTACTTTCTTAACAAAGCAGGACAAGCAGAGTCTTGTCCCGCGTG
TACCTCTCTAGTATTCCAGGGGAAAACTTGTGAGGAACACAAATATAATAATAATCTTTT
GTCATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAAGACAGATGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACTA
GGAGGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGTTCTTCTGGAAATGTATCTTGGTTTCAAGCAATA
AAAGCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCCTGATAAT
GAAAATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGAGACGCCAAGCTAGGTTTAAGCCA
GGTAAAGGTGGAAGAAAACCAGTCCCAGATGCTTGGTATTTTTACTATACTGGAACAGGA
CCAGCCGCTAACCTGAATTGGGGTGATAGCCAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAG
GGTGCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTGACTCTGACAAGTTTGACCAA
TATCCGCTACGGTTTTCAGACGGAGGACCTGATGGTAATTTCCGTTGGGATTTCATTCCT
CTGAATCGTGGCAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGCTTCATCAGCAGCATCTAGTAGAGCA
CCATCACGTGAAGTTTCGCGTGGTCGCAGGAGTGGTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGT
GCAGCAAGGATAATTCAGGATCAGCAGAAGAAGGGTTCTCGCATTACAAAGGCTAAGGCT
GATGAAATGGCTCACCGCCGGTATTGCAAGCGCACTATTCCACCTAATTATAAGGTTGAT
CAAGTGTTTGGTCCCCGTACTAAAGGTAAGGAGGGAAATTTTGGTGATGACAAGATGAAT
GAGGAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCCTAGCAGCCAT
GCTTGTCTTTTCGGAAGTAGAGTGACGCCCAGACTTCAACCAGATGGGCTGCACTTGAAA
TTTGAATTTACTACTGTGGTCCCACGTGATGATCCGCAGTTTGATAATTATGTAAAAATT
TGTGATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAACACGTCCAAAAGATGATGAACCAAGACCAAAG
TCACGCTCAAGTTCAAGACCTGCAACAAGAGGAAATTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCGC
CCTAAGAAGGAGAAAAAGCCAAAGAAGCAGGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCA
GATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTGGAATTTGATGATGAACCCAAGGTAATTAACTGG
GGGGATTCAGCCCTAGGAGAGAATGAACTTTGAGTAAAATTCAATAGTAAGAGTTAAGGA
AGATAGGCATGTAGCTTGATTACCTACATGTCTATCGCCAGGGAAATGTCTAATTTGTCT
ACTTAGTAGCCTGGAAACGAACGGTAGACCCTTAGATTTTAATTTAGTTTAATTTTTAGT
TTAGTTTAAGTTAGTTTAGAGTAGGTATAAAGATGCCAGTGCCGGGGCCACGCGGAGTAC
GACCGAGGGTACAGCACTAGGACGCCCATTAGGGGAAGAGCTAAATTTTAGTTTAAGTTA
AGTTTAATTGGCTATGTATAGTTAAAATTTATAGGCTAGTATAGAGTTAGAGCAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

REPLICASA

Además de los genes estructurales y auxiliares, dos tercios de un genoma del coronavirus comprenden el gen de replicasa (en el extremo 5' del genoma), que se expresa como dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, siendo pp1ab un producto de extensión de pp1a como resultado de un mecanismo de cambio ribosómico de -1. Las dos poliproteínas son escindidas por dos tipos de proteinasas codificadas por virus que, en general, dan lugar a 16 proteínas no estructurales (Nsp1-16); El IBV carece de Nsp1, por lo que codifica a Nsp2-16.

Por lo tanto, el gen 1 del IBV codifica 15 (16 en otros coronavirus) proteínas no estructurales (nsp2-16), que están

asociadas con la replicación y la transcripción del ARN.

La expresión "proteína replicasa" se usa en el presente documento para referirse a las poliproteínas pp1a y pp1ab o subunidades nsp individuales.

La expresión "gen de la replicasa" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas replicasa.

En la Tabla 1, se proporciona un resumen de las funciones de las proteínas nsp de coronavirus.

Tabla 1

Proteína Nsp	Características clave
1	Conservada dentro de, pero no entre grupos genéticos de coronavirus; posibles funciones reguladoras en la célula hospedadora.
2	Dispensable para la replicación del MHV y SARS-CoV en cultivo tisular
3	Dominio ácido; macrodominio con ADRP y actividades de unión a poli(ADP-ribosa); una o dos proteasas de tipo papaína que contienen ZBD; Dominio Y
4	Dominio transmembrana
5	Proteasa principal de tipo 3C, homodímero
6	Dominio transmembrana
7	Interactúa con nsp8 para formar un complejo hexadecamérico
8	ARN polimerasa no canónica; interactúa con nsp7 para formar un complejo hexadecamérico
9	proteína de unión a ARNmc, dímero
10	proteína de unión a ARN, homododecámero, dominio de unión al cinc, se sabe que interactúa con nsp14 y nsp16
11	Desconocida
12	ARN polimerasa dependiente del ARN
13	Dominio de unión al cinc, NTPasa, dNTPasa, ARN y ADN helicasa de 5’ a 3’, ARN 5'-trifosfato
14	exorribonucleasa de 3’ a 5’, dominio de unión al cinc y N7-metiltransferasa
15	Endorribonucleasa específica del uridilato, homohexámero
16	Ribosa-2'-O-metiltransferasa putativa

La variante del gen de la replicasa codificado por el coronavirus de la presente invención comprende una mutación en el apartado de la secuencia que codifica nsp-14 como se define en las reivindicaciones.

Nsp10 tiene actividad de unión al ARN y parece participar en interacciones homotípicas y/o heterotípicas dentro de otras nsp de la región pp1a/pp1ab. Adopta un pliegue α/β compuesto de cinco hélices α, una hélice 3_{10} y tres cadenas β. Se han identificado dos sitios de unión al cinc que están formados por restos de cisteína conservados y un resto de histidina (Cys-74/Cys-77/His-83/Cys-90; Cys-117/Cys-120/Cys-128/Cys-130). Se ha confirmado que la proteína se une a ARN y ADN monocatenario y bicatenario sin una especificidad evidente. Nsp-10 se puede entrecruzar con nsp-9, lo que sugiere la existencia de una red compleja de interacciones proteína-proteína que implican a nsp-7, -8, -9 y -10. Además, se sabe que nsp-10 interactúa con nsp-14 y nsp-16.

La Nsp-14 comprende un dominio activo de exorribonucleasa de 3' a 5' (ExoN) en la región del extremo amino. Se ha demostrado que SARS-CoV ExoN tiene una actividad exorribonucleasa de 3' a 5' dependiente de los iones metálicos que actúa en el ARN tanto monocatenario como bicatenario, pero no en el ADN. Se ha demostrado que Nsp-14 tiene actividad de corrección. También se ha demostrado que esta nsp tiene actividad N7-metiltransferasa (MT) en la región del extremo carboxilo. Se ha informado de la actividad RNasa de NendoU (endoribonucleasa nidovírica, específica de U) asociada a Nsp-15 para varios coronavirus, incluyendo SARS-CoV, MHV e IBV. Se informó en consonancia que las actividades aumentaron significativamente con los iones Mn^{2+} y que hubo poca actividad en presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+}. NendoU se escinde en el lado 3' de los restos de uridilato del ARN monocatenario y bicatenario. El/los sustrato/s biológicamente relevante/s de los coronavirus NendoU aún no se han identificado.

Se ha predicho que Nsp-16 media en la actividad ribosa-2'-O-metiltransferasa (2'-O-MTasa) y los experimentos de genética inversa han demostrado que el dominio 2'-O-MTasa es esencial para la síntesis del ARN vírico en HCoV-229E y SARS-CoV. La enzima puede participar en la producción de las estructuras cap 1 de los ARN de coronavirus y también puede cooperar con NendoU y ExoN en otras vías de procesamiento del ARN. La 2'-O-MTasa también podría metilar los ARN específicos para protegerlos de la escisión mediada por NendoU.

Las secuencias genómicas y proteicas para nsp-10, -14, -15 y -16 se proporcionan como SEQ ID NO: 2-5 y 6-9,

respectivamente.

SEQ ID NO: 2 (secuencia de nucleótidos de nsp-10 - nucleótidos 11884-12318 de SEQ ID NO: 1)

TCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCTTTTGCAGTA
GATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTAGGTAACTGTGTTAAA
ATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAGCCAAGTCCAACTCCGGATCAG
GATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAGAGCACATATAGCACACCTTGGCGGAGCA
GGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGGTTCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGAT
CCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAAGGTTTGCACTGTTTGTCAGTGTTGGATTGGTTATGGATGT
CAGTGTGATTCACTTAGACAACCTAAACCTTCTGTTCAG

SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos de nsp-14 - nucleótidos 16938-18500 de SEQ ID NO: 1)

GGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTTAGTGGTGTTCACCCAGCTTATGCAGTCACA
ACTAAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGTTAATGATGAACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCT
GGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTTAAGATGAGTGTTAATGTTGAA
GGCTGCCACAACATGTTTATAACACGTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTT
GATGTAGAAGCAACACATGCTTGCGGTACTAACATTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTC
TCTACTGGTGCAGACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAATAATTTT
GAGCCTGTGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTATTCAAAAGT
GCTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCAACGTT
TCAGATTGTGTAGTGTTTGTCACGTGGTGTCATGGCCTAGAACTAACCACTTTGCGCTATTTTGTT
AAAATAGGCAAGGACCAAGTTTGTTCTTGCGGTTCTAGAGCAACAACTTTTAATTCTCATACTCAG
GCTTATGCTTGTTGGAAGCATTGCTTGGGTTTTGATTTTGTTTATAATCCACTCTTAGTGGATATT
CAACAGTGGGGTTATTCTGGTAACCTACAATTTAACCATGATTTGCATTGTAATGTGCATGGACAC
GCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGACGCGTTGTCTTGCAATTAATAATGCATTTTGTCAA
GATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTAGCTGTAGA
TATTTACAACGCATGTATCTTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATA
GGCAACCCTAAAGGTATTAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTAGATTCTATGATAAGAAT
CCAATAGTACCCAATGTCAAGCAGTTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGCTGAT

GGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTACTTTGTAGGTAC
GACACACGAAATTTGAGTGTGTTTAACCTACCTGGTTGTAATGGTGGTAGCTTGTATGTTAACAAG
CATGCATTCCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTCGTAATTTGAAAGCTATGCCATTCTTT
TTCTATGACTCATCGCCTTGCGAGACCATTCAATTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTGTCATTA
GCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTTGTAAAAAGCACGCACAAATG
TATGCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAGCTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTTACTAAT
AATTTTAACCCATATAATTTGTGGAAAAGTTTTTCAGCTCTCCAG

SEQ ID NO: 4 (secuencia de nucleótidos de nsp-15 - nucleótidos 18501-19514 de SEQ ID NO: 1)

TCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTCATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATG
CCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTTATAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTTTTTTTT
AATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAATATTCGCACACTG
CCAAACAACCGTATTTTGAAAGGTTTGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTAC
ACGAACCAAACACCACTATACCGTAATACTGTTAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAAT
GGCCTAATAGTGCTGTATGATGATAGATATGGTGATTACCAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCT
GTTTTAGTTTCTACACAGTGTTACAAGCGGTATTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTGTT
CAGAACGGTATTCCGTTAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTTAATGGTGCGTTT
GTTACGCTACCTAACACAATAAACACACAGGGTCGAAGTTATGAAACTTTTGAACCTCGTAGTGAT
GTTGAGCGTGATTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTAGGT
CTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAATTAGGTGGTTTCCACACTGTTATAGGT
ATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACGCAAAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTC
ATGCAAAATTATTTTGTATTGGCAGACAATGGTTCCTACAAGCAAGTGTGTACTGTTGTGGATTTG
CTGCTTGATGATTTCTTAGAACTTCTTAGGAACATACTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAA
GTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATT
AAAACATGTTATCCACAGCTTCAA

SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos de nsp-16 - nucleótidos 19515-20423 de SEQ ID NO: 1)

TCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAGTTCAGAATTGTGTTATGGAACCT
TGCAACATTCCTAATTATGGTGTTGGAATAGCGTTGCCAAGTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAG
TATACACAACTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAACAATGTGTGTACCGCATAATATGCGAGTAATG
CATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGTGCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCA
GAAGGGACACTCCTTGTCGATAATGATATTGTAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTT
TCAGATTGCAATAAATATAAGACAGAGCACAAGTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGAC
AATGATTCAAAAAGAAAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTCATATAT
CTCTCAAGTTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACA
AGTTGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTTGTACAGCA
GTGAATGCCTCTTCTTCAGAAGCATTCTTGATTGGTGTTAATTATTTGGGTGCAAGTGAAAAGGTT
AAGGTTAGTGGAAAAACGCTGCACGCAAATTATATATTTTGGAGGAATTGTAATTATTTACAAACC
TCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTGAGATTGAAAGCAACGCCAGTTGTTAAT
TTGAAAACTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTAATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGA
GATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTACTATGTAG

SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de nsp-10)

SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQ
DSYGGASVCLYCRAHIAHPGGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCTVCQCWIGYGC
QCDSLRQPKPSVQ

SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos de nsp-14)

GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVE
GCHNMFITRDEAIRNVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNF
EPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHVVRPRIVQMLADNLCNVSDCVVFVTWCHGLELTTLRYFV
KIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLVDIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGH
AHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNACVDALKVNVVYDI
GNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNPIVPNVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSLVCRY
DTRNLSVFNLPGCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSL
ATKDCITKCNIGGAVCKKHAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ

SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de nsp-15)

SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKVFVIDQGVEKAVFFNQTILPTSVAFELYAKRNIRTL
PNNRILKGLGVDVTNGFVIWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNA
VLVSTQCYKRYSYVEIPSNLLVQNGIPLKDGANLYVYKRVNGAFVTLPNTLNTQGRSYETFEPRSD
VERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPQLGGLHTVIGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSDV
MQNYFVLADNGSYKQVCTVVDLLLDDFLELLRNILKEYGTNKSKVVTVSIDYHSINFMTWFEDGII
KTCYPQLQ

SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de nsp-16)

SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMRVM
HFGAGSDKGVAPGSTVLKQWLPEGTLLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTD
NDSKRKHEGVIANNGNDDVFIYLSSFLRNNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMFCTA
VNASSSEAFLVGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYLQTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVN
LKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM

PATOGENICIDAD REDUCIDA

El coronavirus atenuado, vivo, de la presente invención comprende una variante del gen de la replicasa como se define en las reivindicaciones, que hace que el virus tenga una patogenicidad reducida en comparación con un coronavirus que expresa el gen de tipo silvestre correspondiente.

El término "atenuado" como se usa en el presente documento, se refiere a un virus que presenta dicha patogenicidad reducida, y se puede clasificar como no virulento. Un virus atenuado, vivo, es un virus replicante debilitado que todavía es capaz de estimular una respuesta inmunitaria y producir inmunidad, pero no puede causar la enfermedad real.

El término "patogenicidad" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado normal para referirse al potencial del virus para causar la enfermedad en un sujeto. Por lo general, la patogenicidad de un coronavirus se determina analizando los síntomas asociados con la enfermedad, por ejemplo, estornudos, tos metálica y reducción de la actividad ciliar traqueal.

La expresión "patogenicidad reducida" se usa para describir que el nivel de patogenicidad de un coronavirus es reducido, atenuado o disminuido en comparación con un coronavirus de tipo silvestre correspondiente.

En una realización, el coronavirus de la presente invención como se define en las reivindicaciones tiene una patogenicidad reducida en comparación con el virus M41-CK parental del que se deriva o un coronavirus de control. El coronavirus de control puede ser un coronavirus con una patogenicidad conocida, por ejemplo, un coronavirus que exprese la proteína replicasa de tipo silvestre.

La patogenicidad de un coronavirus se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por lo general, la patogenicidad se evalúa analizando los síntomas clínicos en un sujeto expuesto al virus, por ejemplo, en un pollo.

A modo ilustrativo, el pollo puede ser expuesto a los 8-24 días de vida a una inoculación nasal u ocular. Los síntomas clínicos, asociados con la infección por IBV, se pueden evaluar de 3 a 10 días después de la infección. Los síntomas clínicos comúnmente evaluados para determinar la patogenicidad de un coronavirus, por ejemplo, un IBV, incluyen jadeos, tos, estornudos, tos metálica, depresión, erizamiento de las plumas y pérdida de la actividad ciliar traqueal.

La variante de la replicasa de la presente invención, cuando se expresa en un coronavirus, puede provocar un nivel reducido de los síntomas clínicos en comparación con un coronavirus que expresa una replicasa de tipo silvestre.

Por ejemplo, un coronavirus que expresa la variante de la replicasa puede causar una serie de tosidos metálicos por ave al minuto que sean menos del 90 %, menos del 80 %, menos del 70 %, menos del 60 %, menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 % o menos del 10 % del número de tosidos metálicos causados por un virus que exprese la replicasa de tipo silvestre.

Un coronavirus que expresa una variante de la replicasa de acuerdo con la presente invención puede causar sibilancias en menos del 70 %, menos del 60 %, menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos de 20 % o menos del 10 % del número de aves de un conjunto de aves infectadas con un virus que expresa la replicasa de tipo silvestre.

Un coronavirus que expresa una variante de la replicasa de acuerdo con la presente invención puede producir una actividad ciliar traqueal que sea al menos el 60%, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % del nivel de actividad ciliar traqueal de las aves no infectadas.

Un coronavirus que expresa una variante de la replicasa de acuerdo con la presente invención puede causar síntomas clínicos, como los definidos en la Tabla 2, a un nivel más bajo que un coronavirus que expresa la replicasa de tipo silvestre.

Tabla 2 Límites de gravedad del IBV según los signos clínicos:

Tos metálica (estornudos) Exudado nasal Ojos llorosos Senos infraorbitarios inflamados Estertores (vibración en la región de la tráquea o bronquios)	Específicos del IBV: Leve (N.B. Los signos respiratorios se vuelven evidentes a partir de 2-3 ppp si van a ocurrir y pueden continuar hasta 7 días).
Postura encorvada/depresión Esponjamiento de las plumas Come y bebe menos	Leve, si se superan los 2 días, se aumenta a moderado

(continuación)

Bebe en exceso: evidente por el cultivo lleno de líquido o la ingesta de agua medida	Específicos del IBV: Leve, si se superan las 24 h, se aumenta a moderado durante un máximo de 2 días. Si todavía bebe en exceso, entonces se ha de proceder a su sacrificio mediante el método del programa 1.
Menos activo, pero sigue evadiendo la captura Pérdida de peso Ni come ni bebe	Leve, si se supera 1 día, se aumenta a moderado.
Las aves se sientan solas y no evaden la captura Dificultad respiratoria grave: por ejemplo, jadeos excesivos Tos metálica y/o estertores durante 7 días en total	Moderado: aves en el punto final. Sacrificio según el método del programa 1.
Encontrado muerta	Grave: informar al titular de la licencia del proyecto. Se realizará un examen post-mortem completo.

La variante de la replicasa de la presente invención, cuando se expresa en un coronavirus, puede hacer que el virus se replique a niveles no patógenos *in ovo*.

Durante el desarrollo de vacunas que se administran *in ovo* a embriones de pollo, se debe prestar atención a dos puntos: el efecto de los anticuerpos maternos sobre las vacunas y el efecto de las vacunas sobre el embrión. Se sabe que los anticuerpos maternos interfieren en la inmunización activa. Por ejemplo, las vacunas con cepas leves no inducen niveles de anticuerpos protectores cuando se administran a pollos de engorde con anticuerpos maternos, ya que estas cepas son neutralizadas por el conjunto de anticuerpos maternos.

Así pues, una partícula vírica debe ser lo suficientemente eficaz en la replicación y propagación para garantizar que no sea neutralizada por los anticuerpos maternos contra el virus. Los anticuerpos maternos son un conjunto finito de anticuerpos eficaces, que disminuyen a medida que el pollo va envejeciendo, y la neutralización del virus de esta manera no equivale al establecimiento de inmunidad a largo plazo para el embrión/polluelo. Para desarrollar inmunidad a largo plazo contra el virus, el embrión y el pollo eclosionado deben desarrollar una respuesta inmunitaria protectora apropiada que sea distinta del efecto de los anticuerpos maternos.

Para que sea útil para la vacunación *in ovo*, el virus además no se debe replicar ni propagar a un nivel que haga que sea patógeno para el embrión.

La patogenicidad reducida en términos del embrión puede significar que el coronavirus provoca una menor reducción de la capacidad de eclosión en comparación con un coronavirus de control de tipo silvestre correspondiente. Por lo tanto, la expresión "sin ser patógeno para el embrión", en el contexto de la presente invención, puede significar "sin causar una reducción de la capacidad de eclosión" en comparación con un coronavirus de control.

Una variante de la replicasa adecuada puede identificarse usando métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden realizar experimentos de exposición comparativos tras la vacunación *in ovo* de embriones con o sin anticuerpos maternos (es decir, en donde la capa se haya vacunado o no contra el VBI).

Si la variante de la replicasa permite que el virus se propague a un nivel que es demasiado alto, el embrión no eclosionará o no será viable tras la eclosión (es decir, el virus es patógeno para el embrión). Un virus que es patógeno para el embrión puede matarlo.

Si la variante de la replicasa causa una reducción en la replicación y la propagación víricas que es demasiado elevada, el virus será neutralizado por los anticuerpos maternos. La posterior exposición del polluelo con el IBV producirá el desarrollo de síntomas clínicos (por ejemplo, sibilancias, tos metálica, pérdida de actividad ciliar) y el inicio de la enfermedad en el polluelo expuesto; ya que no habrá podido desarrollar una inmunidad eficaz contra el virus.

VARIANTE

Como se usa en el presente documento, el término "variante" es sinónimo de "mutante", y se refiere a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que difiere en comparación con la secuencia de tipo silvestre correspondiente.

Una secuencia variante/mutante puede surgir de forma natural, o puede crearse artificialmente (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida). El mutante puede tener al menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad de secuencia con la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre. El mutante puede tener menos de 20, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones sobre la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre.

La expresión "tipo silvestre" se usa para indicar un gen o una proteína que tiene una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos primaria que es idéntica al gen nativo o la proteína nativa, respectivamente (es decir, al gen vírico o a la proteína vírica).

Pueden realizarse comparaciones de identidad a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux *et al.,* 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Los ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al*., 1999 misma referencia- Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al*., 1990, *J. Mol. Biol*., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS, ClustalX (véase Larkin *et al*. (2007) Clustal W y Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948). Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al*., 1999 misma referencia, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. También está disponible una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences para comparar la secuencia proteica y de nucleótidos (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

La secuencia puede tener una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan lugar a una molécula funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos, siempre que se conserve la actividad. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos de grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que se presenta a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y, preferentemente, de la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - no cargados	C S T M
		N Q
	Polares - cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

El coronavirus de la presente invención comprende una variante del gen de la replicasa como se define en las reivindicaciones que codifica una proteína que comprende una mutación en comparación con SEQ ID NO: 7 que, cuando se expresa en un coronavirus, hace que el virus tenga una patogenicidad reducida en comparación con un coronavirus que expresa la correspondiente replicasa de tipo silvestre.

La variante del gen de la replicasa codifica una proteína que comprende una mutación de aminoácido en nsp-14.

La variante del gen de la replicasa del coronavirus como se define en las reivindicaciones de la presente invención puede codificar una proteína que comprende una mutación como se define en las secuencias mod M41 presentadas en la Figura 10.

La variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos:

de Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6,
de Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7;
de Leu a lie en la posición 183 de SEQ ID NO: 8; y
de Val a lie en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede codificar una proteína que no

comprenda una mutación en nsp-2, nsp-3, nsp-6 o nsp-13.

La variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede codificar una proteína que no comprenda una mutación en nsp10 que corresponde a la mutación treonina a isoleucina causada por una mutación en la posición de nucleótido 12.008 del gen publicado por Ammayappan *et al*. (*Arch Virol* (2009) 154:495-499).

Ammayappan *et al* (anterior) informa sobre la identificación de los cambios de secuencia responsables de la atenuación de la cepa del IBV Arkansas DPI. El estudio identificó 17 cambios de aminoácidos en una variedad de proteínas del VBI después de múltiples pasadas, aprox. 100, del virus en huevos embrionados. No se investigó si el virus atenuado (Ark DPI 101) es capaz de replicarse en presencia de anticuerpos maternos contra el virus *in ovo*, sin ser patógeno para el embrión. Dado que este virus fue producido por múltiples pasadas en huevos embrionados SPF, metodología similar para las vacunas clásicas contra el IBV, es probable que este virus sea patógeno para los embriones. El virus también puede ser sensible a los anticuerpos maternos si las gallinas fueran vacunadas con un serotipo similar.

La variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede codificar una proteína que comprende cualquier combinación de una o más mutaciones de aminoácidos proporcionadas en la lista anterior.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende la mutación de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6.

La variante del gen de la replicasa codifica una proteína que comprende la mutación de aminoácidos Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende la mutación de aminoácidos Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende la mutación de aminoácidos Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6, y Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7.

La variante del gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6 y Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8.

La variante del gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7 y Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6, Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7 y Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8.

La variante del gen de la replicasa puede codificar además una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6, Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6, Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7, Leu a Ile en la posición 183 de SEQ ID NO: 8 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa puede codificar una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos Pro a Leu en la posición 85 de SEQ ID NO: 6, Val a Leu en la posición 393 de SEQ ID NO: 7, Leu a Ile en la posición 183

de SEQ ID NO: 8 y Val a Ile en la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

La variante del gen de la replicasa también puede definirse a nivel de nucleótidos.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos dentro de las regiones seleccionadas de la lista de: 11884-12318, 16938-18500, 18501-19514 y 19515-20423 de SEQ ID NO:1.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la variante del gen de la replicasa del coronavirus de la presente invención puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos seleccionadas de la lista de:

de C a T en la posición de nucleótido 12137;
de G a C en la posición de nucleótido 18114;
de T a A en la posición de nucleótido 19047; y
de G a A en la posición de nucleótido 20139;

en comparación con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

Como se usa en el presente documento, el término "sustitución" es sinónimo del término mutación, y significa que el nucleótido de la posición identificada difiere del de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre.

La secuencia de nucleótidos puede comprender cualquier combinación de las sustituciones de nucleótidos seleccionadas de la lista de:

de C a T en la posición de nucleótido 12137;
de G a C en la posición de nucleótido 18114;
de T a A en la posición de nucleótido 19047; y
de G a A en la posición de nucleótido 20139;

en comparación con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución C12137T.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución G18114C.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución T19047A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones C12137T y G18114C.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones C12137T y T19047A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones C12137T y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones G18114C y T19047A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones G18114C y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender las sustituciones T19047A y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución C12137T, G18114C y T19047A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución C12137T, T19047A y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución C12137T, G18114C y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución G18114C, T19047A y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la sustitución C12137T, G18114C, T19047A y G20139A.

La secuencia de nucleótidos puede no comprender una sustitución que corresponda a la sustitución C12008T publicada por Ammayappan *et al.* (como anteriormente).

La secuencia de nucleótidos puede ser natural, sintética o recombinante. Puede ser bicatenaria o monocatenaria, puede ser ADN o ARN, o combinaciones de los mismos. Esto puede ser, por ejemplo, ADNc, producto de la PCR,

secuencia genómica o ARNm.

La secuencia de nucleótidos puede estar optimizada para los codones para la producción en el hospedador/en la célula hospedadora que se escoja.

Se puede aislar, o ser parte de un plásmido, un virus o una célula hospedadora.

PLÁSMIDO

Un plásmido es una molécula de ADN extracromosómica separada del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. Son habitualmente circulares y bicatenarios.

Los plásmidos, o vectores (como a veces se conocen), se pueden usar para expresar una proteína en una célula hospedadora. Por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana puede transfectarse con un plásmido capaz de codificar una determinada proteína, para expresar esa proteína. El término también incluye cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de bacterias que son capaces de alojar partes más largas de ADN.

El plásmido de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región definida de la proteína replicasa. También puede comprender una o más secuencias de nucleótidos de coronavirus adicionales o secuencias de nucleótidos capaces de codificar una o más proteínas de coronavirus tales como el gen S y/o el gen 3.

El plásmido también puede comprender un marcador de resistencia, tal como el gen de guanina xantina fosforribosiltransferasa (gpt) de *Escherichia coli*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (MPA) en presencia de xantina e hipoxantina y que es controlado por el promotor temprano/tardío del virus vaccinia P7.5.

VIRUS VACCINIA RECOMBINANTE

La presente invención también se refiere a un virus vaccinia recombinante (rVV) que comprende una variante del gen de la replicasa como se define en el presente documento.

El virus vaccinia recombinante (rVV) se puede crear usando un sistema de genética inversa basado en virus vaccinia.

En este sentido, también se proporciona un método de preparación de una partícula vírica mediante:

(i) transfectar un plásmido como se ha descrito en el apartado anterior a una célula hospedadora;
(ii) infectar la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de una cepa de coronavirus con un gen de la replicasa;
(iii) permitir que se produzca una recombinación homóloga entre las secuencias del gen de la replicasa en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma del virus recombinante para producir un gen de la replicasa modificado;
(iv) seleccionar el virus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado.

La expresión "gen de la replicasa modificado" se refiere a un gen de la replicasa que comprende una variante del gen de la replicasa como se define en las reivindicaciones.

Específicamente, la expresión se refiere a un gen que se deriva de un gen de la replicasa de tipo silvestre, pero que comprende una secuencia de nucleótidos que le hace codificar una variante de proteína replicasa como se define en el presente documento.

La recombinación puede implicar todo o parte del gen de la replicasa. Por ejemplo, la recombinación puede implicar una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier combinación de nsp-10, nsp-14, nsp-15 y/o nsp-16. La recombinación puede implicar una secuencia de nucleótidos que codifica una mutación de aminoácidos o comprende una sustitución de nucleótidos como se ha definido anteriormente.

El genoma de la cepa de coronavirus puede carecer de la parte de la proteína replicasa correspondiente a la parte proporcionada por el plásmido, de un modo que se forme una proteína modificada mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos proporcionada por el plásmido.

El virus recombinante es aquel adecuado para permitir la recombinación homóloga entre su genoma y el plásmido. El virus vaccinia es particularmente adecuado, ya que se usa habitualmente recombinación homóloga para insertar y eliminar secuencias para el genoma de virus vaccinia.

El método anterior incluye opcionalmente las etapas:
(v) recuperar el coronavirus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).

Se conocen en la técnica métodos de recuperación de coronavirus recombinantes, tales como el IBV recombinante (véase Britton *et al* (2005) véase página 24; y el documento WO2011004146).

Por ejemplo, el ADN del virus recombinante de la etapa (iv) puede insertarse en un plásmido y usarse para transfectar células que expresen la ARN polimerasa T7 citoplasmática. Las células pueden, por ejemplo, infectarse previamente con un virus de la viruela aviar que exprese la ARN polimerasa T7. El coronavirus recombinante puede aislarse después, por ejemplo, del medio de crecimiento.

Cuando el plásmido se inserta en el genoma del virus vaccinia, se forma un producto intermedio inestable. Pueden seleccionarse recombinantes que comprendan el plásmido, por ejemplo, usando un marcador de resistencia en el plásmido.

Después puede verificarse que los recombinantes positivos contienen el gen de la replicasa modificado mediante, por ejemplo, PCR y secuenciación.

Pueden cultivarse grandes reservas del virus de recombinación incluyendo el gen de la replicasa (por ejemplo virus vaccinia recombinante, (rVV) y extraerse el ADN para llevar a cabo la etapa (v).

Se conocen en la técnica sistemas de genética inversa adecuados (Casais *et al* (2001) *J. Virol* 75:12359-12369; Casais *et al* (2003) *J. Virol*. 77:9084-9089; Britton *et al* (2005) *J. Virological Methods* 123:203-211; Armesto *et al* (2008) *Methods in Molecular Biology* 454:255-273).

CÉLULA

El coronavirus puede usarse para infectar una célula.

Se pueden recoger partículas de coronavirus, por ejemplo, del sobrenadante, mediante métodos conocidos en la técnica, y opcionalmente purificados.

La célula puede usarse para producir la partícula de coronavirus.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método de producción de un coronavirus como se define en las reivindicaciones que comprende las siguientes etapas:

(i) infectar una célula con un coronavirus de acuerdo con la invención;
(ii) permitir que el virus se replique en la célula; e
(iii) recoger el virus de la progenie.

También se proporciona una célula capaz de producir un coronavirus usando un sistema de genética inversa. Por ejemplo, la célula puede comprender un genoma de virus recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de codificar el gen de la replicasa de la presente invención.

La célula puede producir virus recombinante (por ejemplo, virus vaccinia) que contenga el gen de la replicasa.

Como alternativa, la célula puede ser capaz de producir coronavirus recombinante mediante un sistema de genética inversa. La célula puede expresar o ser inducida a expresar la polimerasa T7 para rescatar la partícula vírica recombinante.

VACUNA

El coronavirus se puede usar para producir una vacuna. La vacuna puede ser una forma viva atenuada del coronavirus de la presente invención y puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se define en el presente documento, Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" adecuados para su uso en la invención son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos vehículos incluyen, sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada, tampón de fosfato, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones. Se pueden añadir otros diluyentes y excipientes empleados convencionalmente de acuerdo con técnicas convencionales. Dichos vehículos pueden incluir etanol, polioles y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. También se pueden emplear tampones y agentes de ajuste del pH. Los tampones incluyen, sin limitación, sales preparadas a partir de un ácido orgánico o de una base orgánica. Los tampones representativos incluyen, sin limitación, sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, por ejemplo, citratos, ácido ascórbico, ácido glucónico, histidina-Hel, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trimetanmina o tampones fosfato. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa, trehalosa, sacarosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como los basados en la dextrosa de Ringer y similares. También se pueden proporcionar conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), gases inertes y

similares en los vehículos farmacéuticos. La presente invención no está limitada por la selección del vehículo. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, de los componentes descritos anteriormente, que tienen una isotonicidad de pH adecuada, estabilidad y otras características convencionales está dentro de la habilidad de la técnica. Véanse, por ejemplo, Textos tales como "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, pub. 2000; y "The Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4ª Edición, eds. R. C. Rowe *et al*, APhA Publications, 2003.

La vacuna como se define en las reivindicaciones debe administrarse en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que se refiere a una cantidad de un principio activo, por ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados cuando se administra a un sujeto o paciente. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que produce un cambio medido objetivamente en uno o más parámetros asociados a la afección de bronquitis infecciosa, suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la incidencia de la bronquitis infecciosa. Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" abarca el espectro completo de tratamientos para una enfermedad, afección o trastorno. Un agente "terapéutico" de la invención puede actuar de manera profiláctica o preventiva, incluyendo aquellos que incorporan procedimientos diseñados para tratar animales que pueden identificarse como en riesgo (farmacogenética); o de una manera que mejore o sea de naturaleza curativa; o puede actuar para disminuir la velocidad o el alcance de la progresión de al menos un síntoma de una enfermedad o de un trastorno que se esté tratando.

La presente invención también se refiere a un método de producción de dicha vacuna que comprende la etapa de infectar células, por ejemplo, células Vero, comprendiendo una partícula vírica una proteína replicasa como se define en relación con el primer aspecto de la invención.

MÉTODO DE VACUNACIÓN

El coronavirus de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir una enfermedad.

"Tratar" significa administrar la vacuna a un sujeto que tiene una enfermedad existente para atenuar, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para frenar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

"Prevenir" significa administrar la vacuna a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para evitar o alterar la causa de la enfermedad (por ejemplo, la infección) o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad.

La enfermedad puede ser cualquier enfermedad causada por un coronavirus, tal como una enfermedad respiratoria y/o gastroenteritis en seres humanos y hepatitis, gastroenteritis, encefalitis o una enfermedad respiratoria en otros animales.

La enfermedad puede ser bronquitis infecciosa (BI); diarrea epidémica porcina; gastroenteritis transmisible; virus de la hepatitis de ratón; encefalomielitis hemaglutinante porcina; síndrome respiratorio agudo grave (SARS); o enfermedad de Bluecomb.

La enfermedad puede ser bronquitis infecciosa.

La vacuna puede administrarse a polluelos eclosionados o a pollos, por ejemplo, mediante un colirio o administración intranasal. Aunque son precisos, estos métodos pueden ser caros, por ejemplo, para grandes grupos de pollos de engorde. Las alternativas incluyen inoculación por pulverización o administración al agua para beber, pero puede ser difícil garantizar la aplicación de la vacuna uniforme usando dichos métodos.

La vacuna puede proporcionarse en una forma adecuada para su administración, tal como un colirio para uso intraocular.

La vacuna puede administrarse mediante la inoculación *in ovo,* por ejemplo, mediante inyección de huevos embrionados. La vacunación *in ovo* tiene la ventaja de que proporciona una resistencia de estadio temprano a la enfermedad. También facilita la administración de una dosis uniforme por sujeto, a diferencia de la inoculación por pulverización y administración a través del agua para beber.

La vacuna puede administrarse a cualquier compartimento adecuado del huevo, Incluyendo el fluido alantoideo, el saco vitelino, el amnios, la celda de aire o embrión. Puede administrarse debajo de la membrana de la cáscara (celda de aire) y membrana corioalantoidea.

Habitualmente, la vacuna se inyecta a huevos embrionados durante los estadios tardíos del desarrollo embrionario, en general, durante el último trimestre del período de incubación, tal como 3-4 días antes de eclosionar. En los pollos,

la vacuna puede administrarse entre el día 15 y el 19 del período de incubación de 21 días, por ejemplo, al día 17 o 18.

El proceso puede automatizarse usando un proceso de inyección robótico, tal como el descrito en el documento WO 2004/078203.

La vacuna puede administrarse junto con una o más vacunas distintas, por ejemplo, vacunas para otras enfermedades, tales como virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende una vacuna desvelada en el presente documento junto con una o más vacunas distintas. También se proporciona un kit que comprende una vacuna descrita en el presente documento junto con una o más vacunas distintas para la administración separada, secuencial o simultánea.

La vacuna o composición de vacuna de la invención pueden usarse para tratar un sujeto humano. Por ejemplo, el sujeto puede ser un polluelo, un pollo o un ratón (tal como un ratón de laboratorio, por ejemplo, ratón transgénico).

Por lo general, un médico o veterinario determinará la dosis real que será más adecuada para cada sujeto o grupo de sujetos, y variará con la edad, el peso y la respuesta del/de los sujeto/s en particular.

La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el vehículo, excipiente o diluyente, uno o más aglutinantes, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de recubrimiento, agentes de solubilización y otros agentes portadores adecuados que puedan ayudar o aumentar la administración o la inmunogenicidad del virus.

A continuación, se describirá la invención además por medio de ejemplos, que se pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la materia a llevar a cabo la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - Generación de un sistema de genética inversa DEL IBV basado en M41-CK

Se produjo un ADNc de longitud completa DE M41-CK mediante el reemplazo del ADNc de Beaudette en el sistema de genética inversa del virus Vaccinia descrito previamente en el documento WO2011/004146 con ADNc sintético derivado de la secuencia consenso de M41.

El ADNc del IBV dentro de la estructura del virus Vaccinia recombinante (rVV) rVV-BeauR-Rep-M41 descrita en Armesto, Cavanagh y Britton (2009). PLoS ONE 4(10): e7384. doi:10.1371/journal.pone.0007384, que consistía en la replicasa derivada de la cepa Beaudette del IBV, y los genes estructurales y auxiliares y la UTR de 3' del IBV M41-CK, se modificó además mediante el reemplazo de la secuencia de UTR de 5'-Nsp2-Nsp3 de Beaudette por la secuencia correspondiente del IBV M41-CK. El ADNc del IBV resultante consistió en UTR de 5'-Nsp2-Nsp3 de M41, Nsp4-Nsp16 de Beaudette, y los genes estructurales y auxiliares y UTR de 3' de M41. Este ADNc se modificó además mediante la eliminación de la secuencia de Nsp4-Nsp16 de Beaudette. El ADNc resultante, carente de Nsp4-16, se modificó en cuatro etapas adicionales en las que las Nsp eliminadas se reemplazaron secuencialmente con las secuencias correspondientes de M41-CK, los ADNc de reemplazo representaron Nsp4-8, Nsp9-12, Nsp12-14 de M41-CK, y finalmente Nsp15-16. Cada ADNc de reemplazo contenía aprox. 500 nucleótidos en el extremo 5' correspondiente a la secuencia de M41 más 3' insertada previamente y aprox. 500 nucleótidos en el extremo 3' correspondiente a la secuencia del gen S de M41. Esto permitió la inserción de la secuencia de ADNc de M41 mediante recombinación homóloga y la adición secuencial de la secuencia contigua del gen de la replicasa de M41. Los ADNc sintéticos que contienen las secuencias de Nsp derivadas de M41 se añadieron mediante recombinación homóloga usando el sistema de selección dominante transitoria (TDS) descrito anteriormente por el inventor (véase el documento WO2011/004146). Los ADNc derivados de M41 que contienen la secuencia correspondiente a Nsps-10, -14, -15 y -16 de M41 contenían los aminoácidos modificados en las posiciones 85, 393, 183 y 209, respectivamente, como se indica en la Figura 10.

Se generó un ADNc de longitud completa que representa el genoma de M41-CK en el virus Vaccinia que representa las secuencias sintéticas. Se rescataron dos rIBV, M41-R-6 y M41-R-12, y se mostró que crecían de manera similar a M41-CK (Fig. 1).

EJEMPLO 2 - Determinación de la patogenicidad de los virus M41 rescatados

Se usaron los virus rescatados en el Ejemplo 1 para infectar polluelos libres de patógenos específicos (SPF) de 8 días de vida mediante inoculación ocular y nasal para evaluar su patogenicidad, según lo observado por los signos clínicos diariamente 3-7 días después de la infección y para la actividad ciliar los días 4 y 6 después de la infección. La pérdida de actividad ciliar es un método bien establecido para determinar la patogenicidad del IBV. Se descubrió que los dos virus M41-R eran patógenos en comparación con M41-CK, aunque mostraban algunos signos clínicos en comparación

con los polluelos de control no infectados (Fig. 2) y algunas pérdidas, pero inconsistentes, de la actividad ciliar (Fig. 3).

Por lo tanto, los clones moleculares M41-R de M41-CK no eran patógenos en comparación con el virus parental M41-CK.

Los inventores identificaron varias diferencias de nucleótidos en las secuencias de M41-R en comparación con las secuencias de M41-CK. La mayoría de estas eran mutaciones sinónimas, ya que el cambio de nucleótidos no afectó a la secuencia de aminoácidos de la proteína asociada con la secuencia. Sin embargo, se identificaron cuatro mutaciones no sinónimas en el gen de la replicasa del IBV específico de los componentes Nsp-10, Nsp-14, Nsp-15 y Nsp-16 del gen de la replicasa, y estas mutaciones dieron lugar a cambios de aminoácidos (Tabla 3).

Tabla 3. Mutaciones no sinónimas identificadas en las Nsp del genoma de longitud completa de M41-R

Región de la replicasa	Posición de los nucleótidos	Mutación de nucleótidos	Cambio de aminoácidos
Nsp10	12137	C→T	Pro→Leu
Nsp14	18114	G→C	Val→Leu
Nsp15	19047	T→A	Leu→Ile
Nsp16	20139	G→A	Val→Ile

EJEMPLO 3 - Reparación de los rIBV de M41-R

Para determinar si las mutaciones identificadas eran responsables de la pérdida de patogenicidad asociada con M41-R, se reparó la mutación Nsp10 y se repararon las mutaciones en Nsp-14, -15 y -16, y se demostró que crecían de manera similar a M41-CK (Fig. 9). Los inventores generaron así los rIBV, M41R-nsp10rep y M41 R-nsp14, 15, 16rep, usando ADNc sintéticos que contenían los nucleótidos correctos utilizando el sistema descrito anteriormente (TDS) del inventor (véase el documento WO2011/004146).

Se evaluó la patogenicidad de los rIBV en polluelos como se ha descrito anteriormente. Ambos rIBV mostraron una mayor patogenicidad en comparación con M41-R, pero no con el nivel observado con M41-CK (Fig. 4 y 5). M41R-nsp14, 15, 16rep dio más signos clínicos y una mayor reducción de la actividad ciliar que M41R-nsp10rep. En general, estos resultados indicaron que los cambios asociados con las cuatro Nsp parecen afectar a la patogenicidad.

Para determinar las funciones de las Nsp en la patogenicidad, se usó el ADNc de longitud completa correspondiente a M41R-nsp10rep para reparar las mutaciones en Nsps14, 15 y 16 usando un ADNc sintético que contenía los nucleótidos correctos usando el sistema TDS.

Se produjeron los siguientes rIBV:

M41R-nsp10, 15rep - M41-R con las mutaciones en Nsp-10 y Nsp-15 reparadas
M41R-nsp10, 14, 15rep- M41-R con mutaciones en Nsp-10, -14 y -15 reparadas
M41R-nsp10, 14, 16rep- M41-R con mutaciones en Nsp-10, -14 y -16 reparadas
M41R-nsp10, 15, 16rep- M41-R con mutaciones en Nsp-10, -15 y -16 reparadas
M41-K - Las cuatro mutaciones, Nsp-10, -14, -15 y -16 reparadas en M41-R

Se demostró que los rIBV crecían de manera similar a M41-CK (Fig. 9) y se evaluó la patogenicidad como se ha descrito anteriormente. M41-K (en el que se habían reparado las cuatro mutaciones) produjo signos clínicos y una pérdida del 100 % de la actividad ciliar (ciliostasis completa) a los 4 días después de la infección (Fig. 6, 7 y 8). Los otros rIBV demostraron niveles variables de patogenicidad, aparte de M41R-nsp10, 15, 16rep, que era esencialmente apatógeno. Estos resultados confirmaron que la reparación de las cuatro Nsp restableció la patogenicidad a M41-R; apoyando nuevamente la evidencia previa de que las mutaciones descritas en las cuatro Nsp están implicadas en la atenuación de M41-CK.

Los inventores también generaron rIBV M41R-nsp 10, 14 rep (nsp 10 y 14 se reparan, nsp 15 y 16 contienen mutaciones) y rIBV M41R-nsp 10, 16 rep (nsp 10 y 16 se reparan, nsp 14 y 15 contienen mutaciones) y evaluaron la patogenicidad de estos virus.

rIBV M41R-nsp 10, 14 rep fue menos patógeno que M41-K, pero causó aproximadamente el 50 % de ciliostasis en los días 4-6 posteriores a la infección. rIBV M41R-nsp 10, 16 rep fue casi patógeno, y no causó ciliostasis (véase la Figura 11a-c).

Por lo tanto, el genoma asociado con M41-R es un genoma potencial de estructura principal para un IBV racionalmente atenuado.

EJEMPLO 4 - Estudio de vacunación/exposición con M41-R

Se probaron los virus de la vacuna candidata en estudios en los que se vacunaron huevos de gallina fertilizados *in ovo* a los 18 días de la embrionación, y en los que se determinó la capacidad de eclosión de los huevos inoculados. Se investigó la salud clínica de los pollos, y los pollos se expusieron a los 21 días de nacer a un virus de exposición virulento M41 de BI a DIE_{50} de $10^{3.65}$ por dosis.

Se investigaron los signos clínicos tras la protección mediante la exposición con la vacuna, y se realizó una prueba de ciliostasis a los 5 días después de la exposición para investigar el efecto de los virus de exposición sobre el movimiento de los cilios y la protección de la vacuna contra la ciliostasis (inhibición del movimiento de los cilios).

Vacunación in ovo en huevos de engorde comerciales

El diseño del experimento se da en la Tabla 4 y los resultados clínicos se dan en la Tabla 5. La capacidad de eclosión de los huevos inoculados con M41-R de BI fue buena y los pollos resultaron ser sanos. M41-R de BI protegió contra los signos clínicos tras la exposición en los pollos de engorde (placebo: 19/19 afectados, M41-R de BI: 3/18 afectados y 1 fallecido). Los resultados de la prueba de ciliostasis se dan en la Tabla 6. M41-R de BI generó protección contra la ciliostasis.

Tabla 4 - Diseño de un estudio de capacidad de eclosión, seguridad y eficacia en huevos comerciales

Tratamiento	Descripción del tratamiento	DIE_{50}[1] por dosis	Vía de administración	Día/s de administración	Día/s de exposición[2]	Fin del estudio	N.º de huevos por tratamiento
T01	Ninguno	NA	NA	NA	NA	NA	30
T02	M41-R de BI	10^4	*In ovo*	18 días de embrionación	A los 21 días de nacer, 20 pollos por grupo	A los 26 días de nacer	30
NTX	Solución salina	NA	*In ovo*				30

[1] 0,1 ml de volumen de dosis, NA, no aplicable.
[2] $10^{3.65}$ DIE_{50} por dosis.

Tabla 5: Porcentajes de eclosión y datos clínicos antes y después de la exposición en pollos comerciales, para el diseño véase la Tabla 1.

Tratamiento	Eclosión/total	Vital/total	Antes de la exposición		Después de la exposición	
			Fallecimientos/total	Síntomas/total	Fallecimientos/total	Síntomas/total
Ninguno	28/30	Sacrificado directamente después de la eclosión para la extracción de sangre				
M41-R de BI	28/30	28/28	1/20	0/19	1/19	3/18[1,7]
Solución salina	29/30	29/29	1/20	0/19	0/19	19/19[1,2,3,4,5,6,7]

[1] Sistema respiratorio afectado
[2] Zumbidos
[3] Cambio de voz
[4] Dificultad respiratoria
[5] Senos intraorbitales inflamados
[6] Crecimiento desigual
[7] Débil

Tabla 6 - Resultados de la prueba de ciliostasis tras la exposición, para el diseño véase la Tabla 1.

Tratamiento	Protegido/total	Porcentaje de protección
Solución salina	0/19	0 %
M41R de BI	5/18	28 %

Vacunación in ovo en huevos específicos libres de patógenos (SPF)

El diseño del estudio en huevos SPF se da en la Tabla 7, y es similar al diseño de los estudios con pollos de engorde comerciales, pero la dosis de vacunación para M41-R de BI fue superior, (DIE_{50} de 10^5 por dosis).

Los resultados (Tabla 8) muestran que el porcentaje de eclosión para la eclosión de M41-R de BI fue bajo, y eclosionaron 19 de 40, siendo los polluelos débiles. Fallecieron ocho polluelos. Se expusieron los 11 pollos restantes, y se expusieron 11 de los polluelos nacidos de los huevos que habían sido inoculados con solución salina.

En la prueba de ciliostasis posterior a la exposición, parecía que todos los pollos vacunados *in ovo* con M41-R de BI

estaban protegidos, mientras que ninguno de los controles fue protegido, véase la Tabla 9.

Tabla 7. Diseño de un estudio de capacidad de eclosión, seguridad y eficacia en huevos SPF

Tratamiento	Descripción del tratamiento	DIE_{50}[1] por dosis	Vía de administración	Día de administración	Días de exposición[2]	Fin del estudio	N.º de huevos por tratamiento
T01	M41-R de BI	10^5	*In ovo*	18 días de embrionación	A los 21 días de nacer	A los 26 días de nacer	40
T04	Solución salina	NA	*In ovo*				40
NTX	NA	NA	NA		NA		10

[1] 0,1 ml de volumen de dosis, NA, no aplicable.
[2] DIE_{50} de $10^{3.3}$ de la dosis de exposición en 0,2 ml.

Tabla 8. Porcentajes de eclosión y datos clínicos antes y después de la exposición en pollos SPF, para el diseño véase la Tabla 7.

Tratamiento	Eclosión/total	Vital/total	Antes de la exposición		Después de la exposición	
			Fallecimientos/total	Síntomas/total	Fallecimientos/total	Síntomas/total
M41-R de BI	19/40	11/40	8/40	débiles	0	0
Solución salina	30/40	30/40	0	-	0	0
NA	9/10	9/10	0	-	-	-

Tabla 9. Resultados de la prueba de ciliostasis tras la exposición, para el diseño véase la Tabla 7.

Tratamiento	Protegido/total	Porcentaje de protección
Solución salina	0/11	0 %
M41R de BI	11/11	100 %

En conclusión, M41-R de BI fue seguro en huevos comerciales, generó protección contra los signos clínicos y, hasta cierto punto, contra la ciliostasis.

En los huevos SPF vacunados con M41R de BI, eclosionó un número relativamente bajo de pollos. Esto puede deberse a la DIE_{50} DE 10^5 por huevo de M41-R de BI usado. Esto fue 10 veces superior a la dosis usada en estudios anteriores en los que hubo un mayor nivel de capacidad de eclosión. Los porcentajes de eclosión más bajos también pueden estar causados por una susceptibilidad particularmente elevada del lote de huevos SPF para los virus, como en otros estudios, el nivel de mortalidad embrionaria también fue más alto de lo que se había observado previamente.

Tras la exposición, todos los pollos supervivientes tras la eclosión quedaron completamente protegidos contra la ciliostasis. Se concluye que M41-R de BI tiene un gran potencial como vacuna para su administración *in ovo*.

REIVINDICACIONES

1. Un coronavirus atenuado, vivo, que comprende una variante del gen de la replicasa codificante de poliproteínas que comprenden una mutación en nsp-14, en donde la variante del gen de la replicasa codifica una proteína que comprende una mutación de aminoácidos de Val a Leu en la posición correspondiente a la posición 393 de SEQ ID NO: 7.

2. El coronavirus de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además una mutación en una o más de nsp-10 correspondiente a SEQ ID NO: 6, nsp-15 correspondiente a SEQ ID NO: 8 y nsp-16 correspondiente a SEQ ID NO: 9.

3. El coronavirus de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la variante del gen de la replicasa codifica una proteína que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas entre: una mutación de aminoácidos de Pro a Leu en la posición correspondiente a la posición 85 de SEQ ID NO: 6, una mutación de aminoácidos de Leu a Ile en la posición correspondiente a la posición 183 de SEQ ID NO: 8 y una mutación de aminoácidos de Val a Ile en la posición correspondiente a la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

4. El coronavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el gen de la replicasa codifica una proteína que comprende las mutaciones de aminoácidos: Pro a Leu en la posición correspondiente a la posición 85 de SEQ ID NO: 6; Val a Leu en la posición correspondiente a la posición 393 de SEQ ID NO: 7; Leu a Ile en la posición correspondiente a la posición 183 de SEQ ID NO: 8; y Val a Ile en la posición correspondiente a la posición 209 de SEQ ID NO: 9.

5. El coronavirus de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que es un virus de bronquitis infecciosa (IBV), preferentemente, M41 de IBV.

6. El coronavirus de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una proteína S, al menos parte de la cual es de un serotipo del IBV distinto de M41, preferentemente, en donde la subunidad S1 es de un serotipo del IBV diferente de M41 o en donde la proteína S es de un serotipo del IBV diferente de M41.

7. Una variante del gen de la replicasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Una proteína codificada por una variante del gen de la replicasa de coronavirus de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Un plásmido que comprende un gen de la replicasa de acuerdo con la reivindicación 7.

10. Un método de fabricación del coronavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende las siguientes etapas:

(i) transfectar un plásmido de acuerdo con la reivindicación 9 a una célula hospedadora;
(ii) infectar la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de una cepa de coronavirus con un gen de la replicasa, preferentemente, en donde el virus recombinante es un virus vaccinia;
(iii) permitir que se produzca una recombinación homóloga entre las secuencias del gen de la replicasa en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma del virus recombinante para producir un gen de la replicasa modificado; e
(iv) seleccionar el virus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado; que comprende, opcionalmente, además la etapa de
(v) recuperar el coronavirus recombinante que comprende el gen de la replicasa modificado del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).

11. Una vacuna que comprende un coronavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en la prevención de una enfermedad en un sujeto, preferentemente, en donde la enfermedad es bronquitis infecciosa (BI), lo más preferentemente, en donde la vacunación es vacunación *in ovo*.

13. La vacuna para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la vacuna se administra mediante; administración de gotas oculares, administración intranasal, administración en agua potable, inyección posterior a la eclosión o inyección *in ovo*.

14. Un método de producción de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la etapa de infectar una célula hospedadora con un coronavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

FIGURA 1

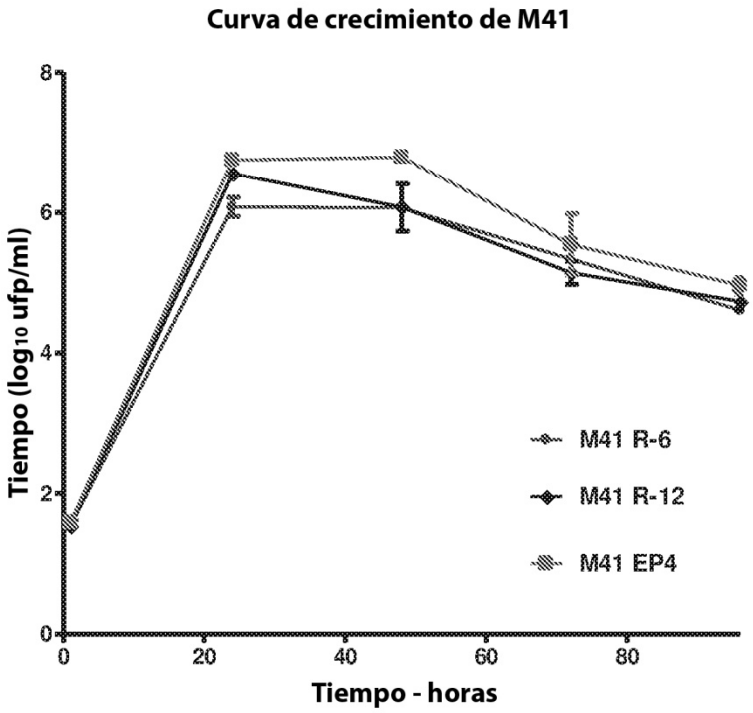
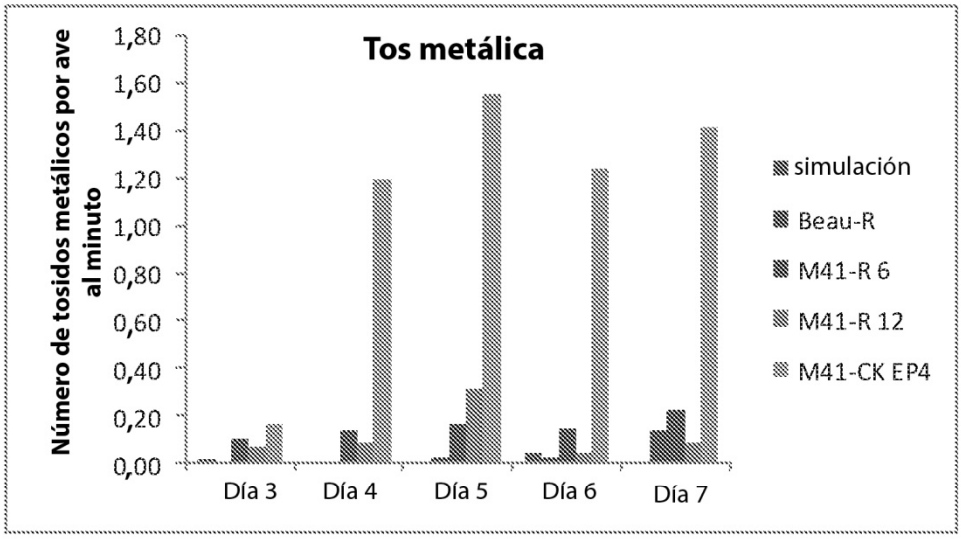

Curva de crecimiento de M41
Tiempo (log10 ufp/ml)
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
Tiempo - horas
M41 R-6
M41 R-12
M41 EP4

FIGURA 2


Tos metálica
Número de tosidos metálicos por ave al minuto
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
simulación
Beau-R
M41-R 6
M41-R 12
M41-CK EP4

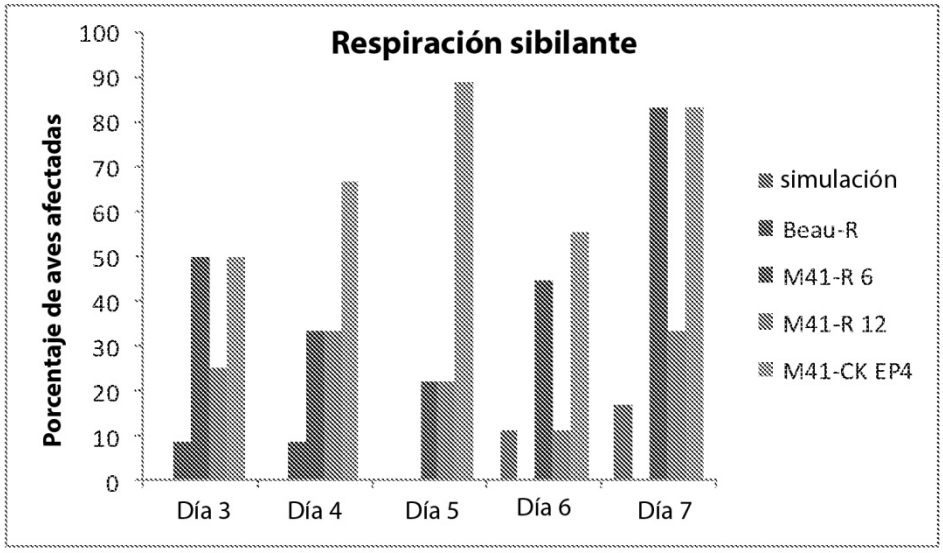

Respiración sibilante
Porcentaje de aves afectadas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
simulación
Beau-R
M41-R 6
M41-R 12
M41-CK EP4

FIGURA 3

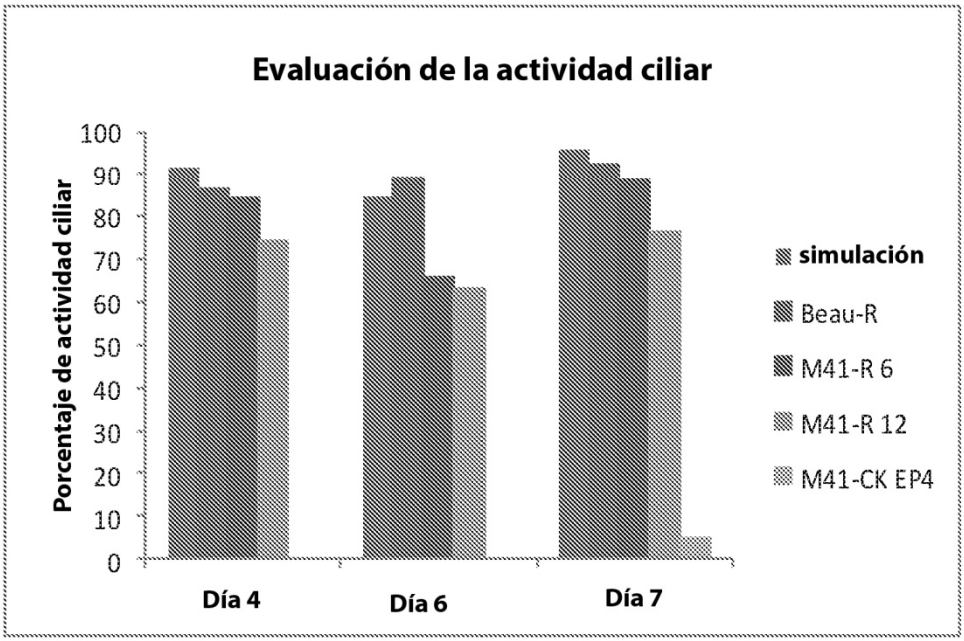

Evaluación de la actividad ciliar
Porcentaje de actividad ciliar
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Día 4
Día 6
Día 7
simulación
Beau-R
M41-R 6
M41-R 12
M41-CK EP4

FIGURA 4

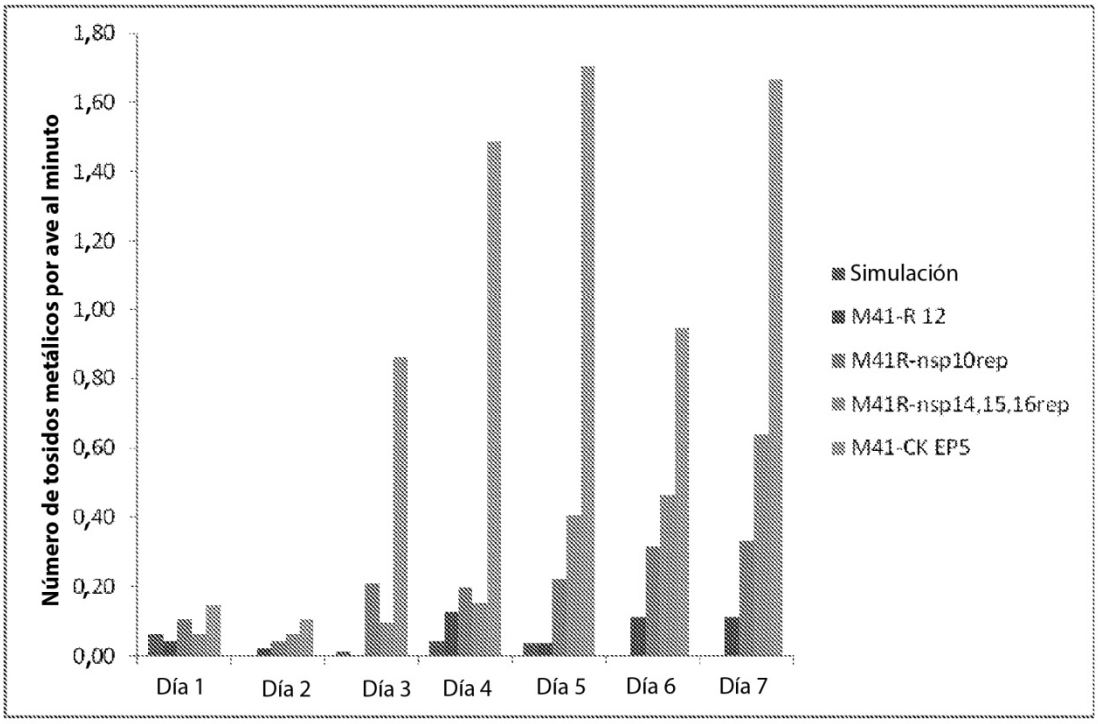

Número de tosidos metálicos por ave al minuto
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Día 1
Día 2
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Simulación
M41-R 12
M41R-nsp10rep
M41R-nsp14,15,16rep
M41-CK EP5

FIGURA 5

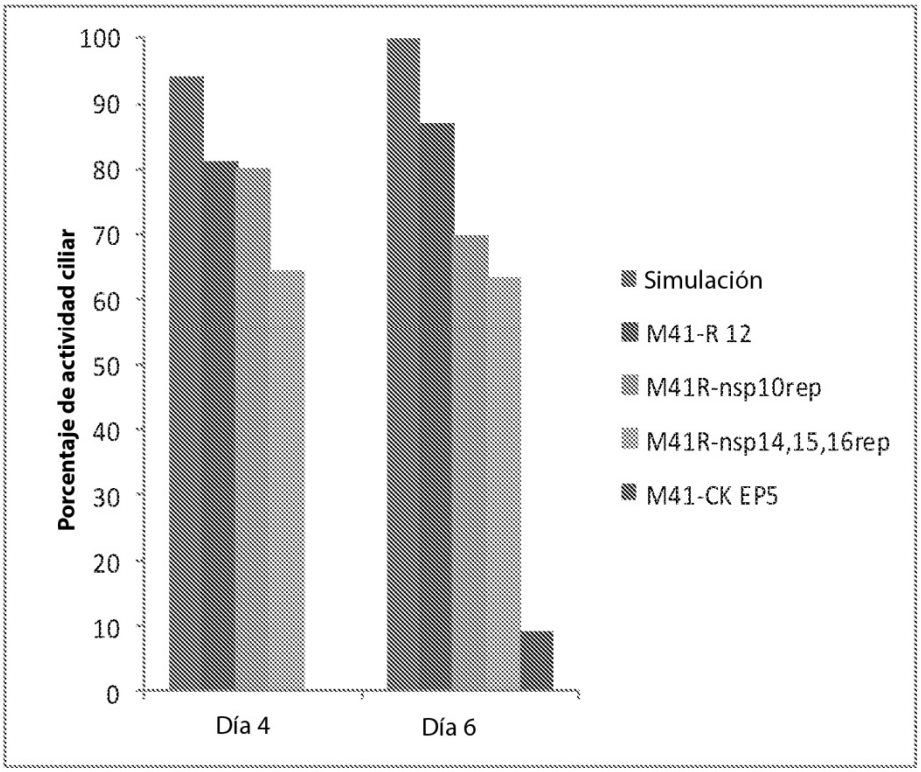

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Porcentaje de actividad ciliar
Día 4
Día 6
Simulación
M41-R 12
M41R-nsp10rep
M41R-nsp14,15,16rep
M41-CK EP5

FIGURA 6

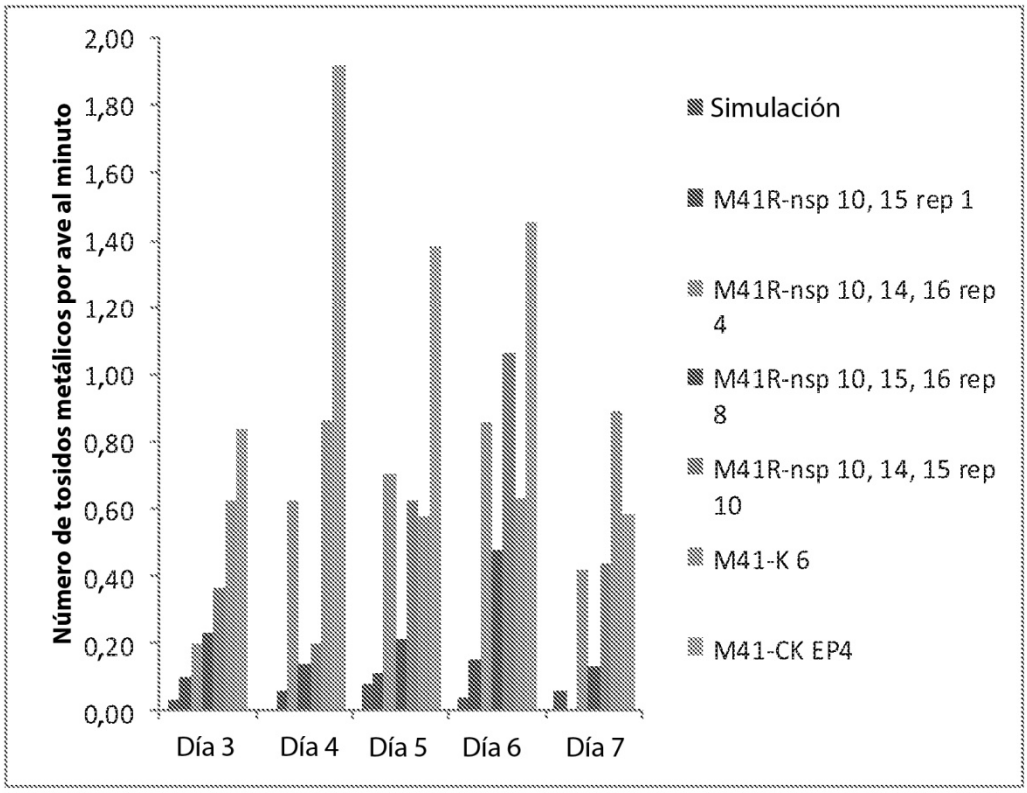

Número de tosidos metálicos por ave al minuto
2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Simulación
M41R-nsp 10, 15 rep 1
M41R-nsp 10, 14, 16 rep 4
M41R-nsp 10, 15, 16 rep 8
M41R-nsp 10, 14, 15 rep 10
M41-K 6
M41-CK EP4

FIGURA 7

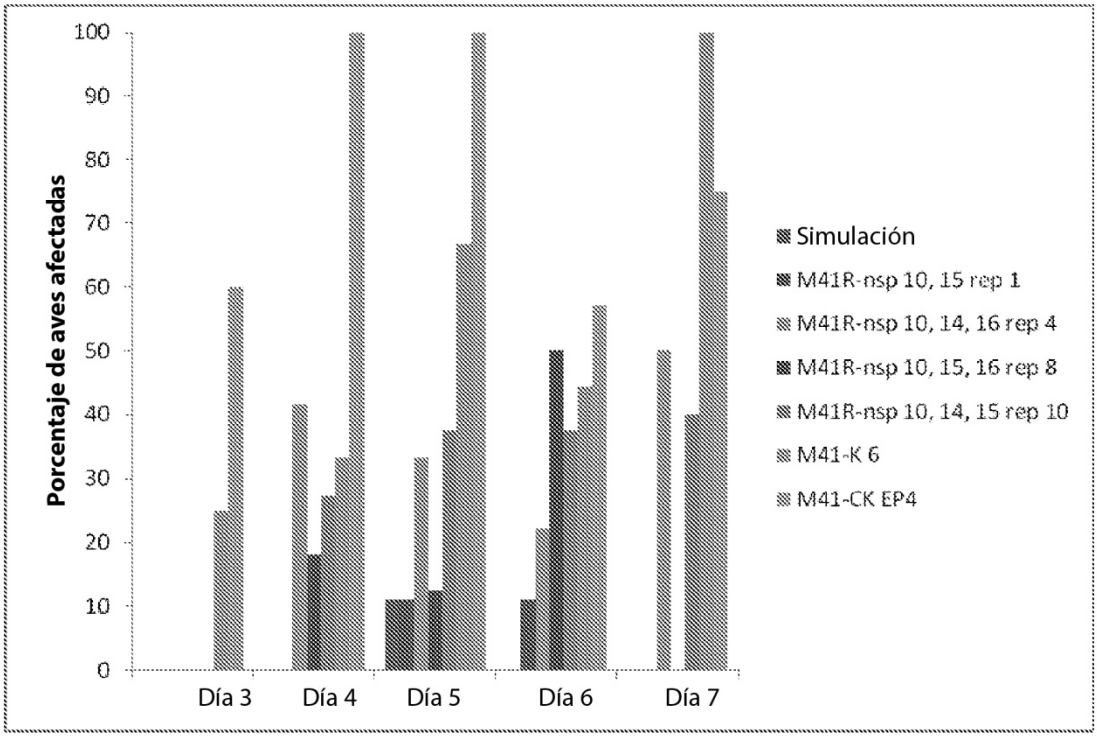

Porcentaje de aves afectadas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Simulación
M41R-nsp 10, 15 rep 1
M41R-nsp 10, 14, 16 rep 4
M41R-nsp 10, 15, 16 rep 8
M41R-nsp 10, 14, 15 rep 10
M41-K 6
M41-CK EP4

FIGURA 8

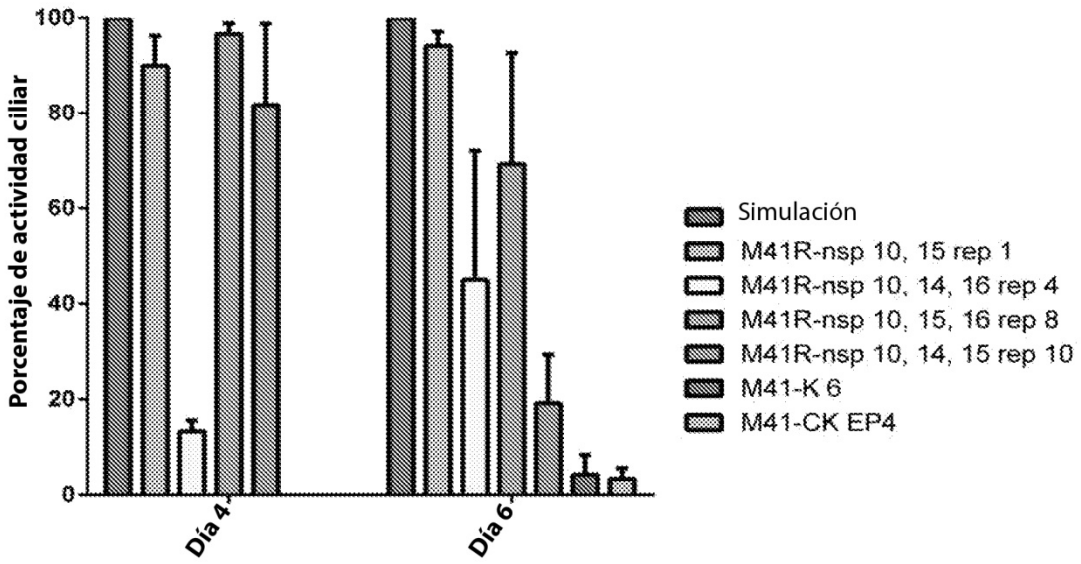
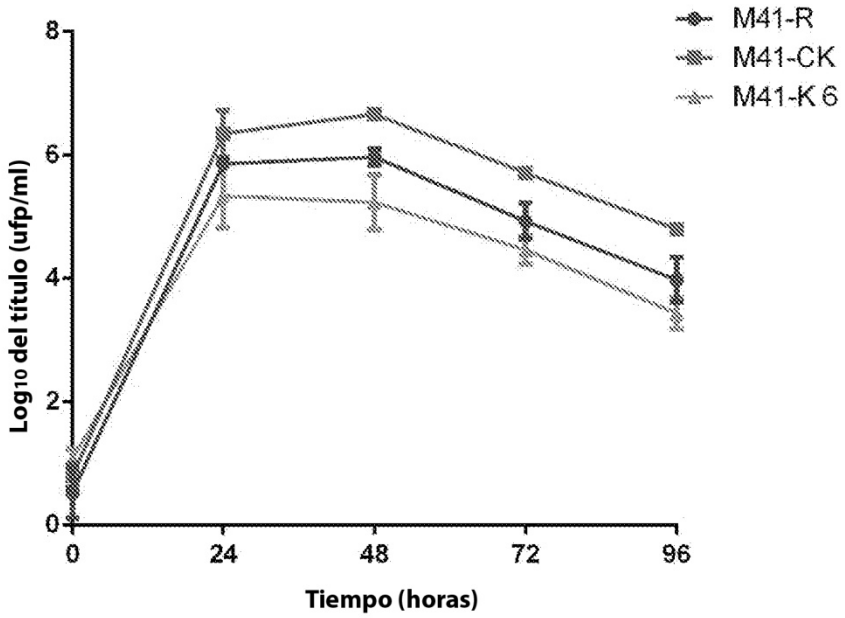

Porcentaje de actividad ciliar
100
80
60
40
20
0
Día 4
Día 6
Simulación
M41R-nsp 10, 15 rep 1
M41R-nsp 10, 14, 16 rep 4
M41R-nsp 10, 15, 16 rep 8
M41R-nsp 10, 14, 15 rep 10
M41-K 6
M41-CK EP4

FIGURA 9

A


M41-R
M41-CK
M41-K 6
Log10 del título (ufp/ml)
0
2
4
6
8
0
24
48
72
96
Tiempo (horas)

B

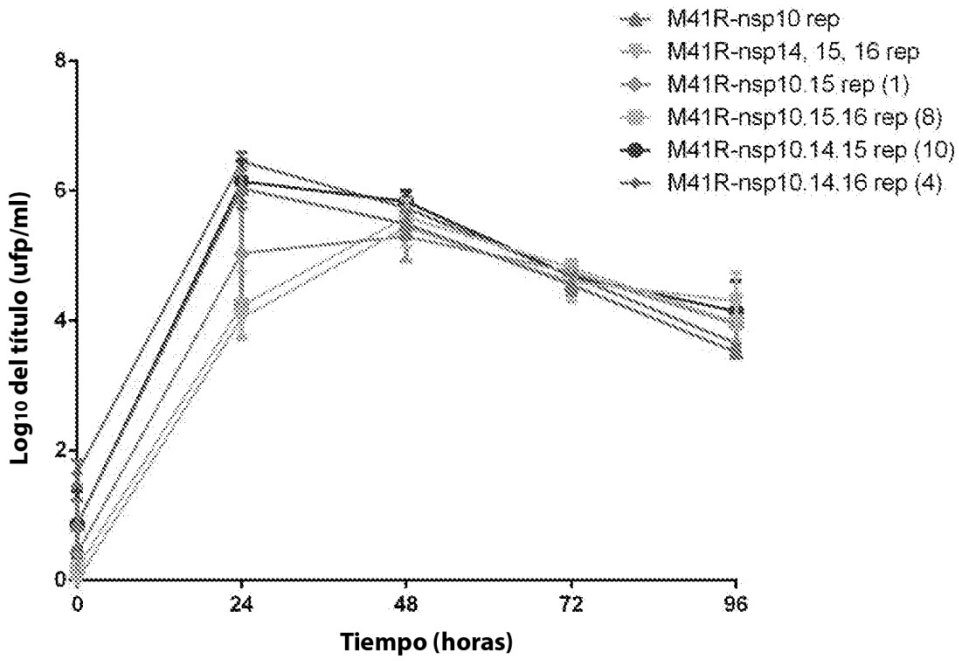

M41R-nsp10 rep
M41R-nsp14, 15, 16 rep
M41R-nsp10.15 rep (1)
M41R-nsp10.15.16 rep (8)
M41R-nsp10.14.15 rep (10)
M41R-nsp10.14.16 rep (4)
Log10 del título (ufp/ml)
0
2
4
6
8
0
24
48
72
96
Tiempo (horas)

FIGURA 10

Nsp10

```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
M41 Nsp10:SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGKQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA
Mod Nsp10:SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGKQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA

                    *       100         *       120         *       140
M41 Nsp10:HIAHPEGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCTVCQCWIGYGCQCDSLRQPKPSVQ
Mod Nsp10:HIAHPEGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCTVCQCWIGYGCQCDSLRQPKPSVQ
```

Nsp14

```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
M41 Nsp14:GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVITKALAAYKVNDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKSVNVEGCHKMFITRDEAIR
Mod Nsp14:GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVITKALAAYKVNDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKSVNVEGCHKMFITRDEAIR

                    *       100         *       120         *       140         *       160
M41 Nsp14:NVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHV
Mod Nsp14:NVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHV

                    *       180         *       200         *       220         *       240
M41 Nsp14:VRPRIVQMLADNLCNVSDCVVFVTWCHSLELITLRYFVKIGKDQVCSCGSRATFFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLV
Mod Nsp14:VRPRIVQMLADNLCNVSDCVVFVTWCHSLELITLRYFVKIGKDQVCSCGSRATFFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLV

                    *       260         *       280         *       300         *       320
M41 Nsp14:DHQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNACVD
Mod Nsp14:DHQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNACVD

                    *       340         *       360         *       380         *       400
M41 Nsp14:ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRKLDLNFRFYDKNPIVPNVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSIVCRYDTRN
Mod Nsp14:ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRKLDLNFRFYDKNPIVPNVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSICRYDTRN

                    *       420         *       440         *       460         *       480
M41 Nsp14:LSVFNLPGCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLAKDCITRCNIGGAVCRK
Mod Nsp14:LSVFNLPGCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLAKDCITRCNIGGAVCKK

                    *       500         *       520
M41 Nsp14:HAQMYADFVISYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ
Mod Nsp14:HAQMYADFVISYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ
```

Nsp15

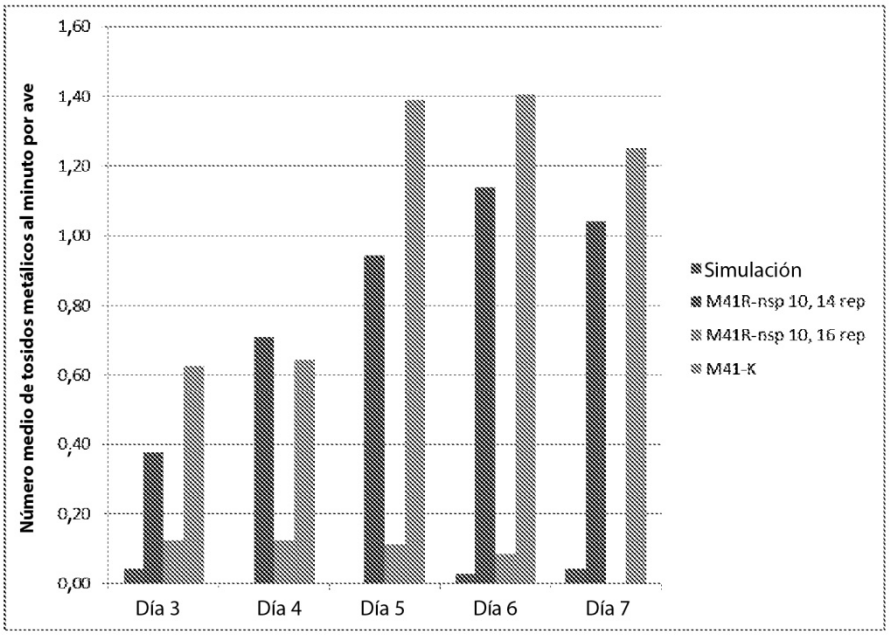
```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
M41 Nsp15:SIDNIAYNMYRGGHYDAIAGEMPIIVTGNKVFVIDQGVEKAVFFNQTILPTSVAFELYAKRNIRTLPNNRILKGLGVDVT
Mod Nsp15:SIDNIAYNMYRGGHYDAIAGEMPIIVTGNKVFVIDQGVEKAVFFNQTILPTSVAFELYAKRNIRTLPNNRILKGLGVDVT

                    *       100         *       120         *       140         *       160
M41 Nsp15:NGEVIWDYTNQIPLYRNTVEVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAANAVLVSTQCYNRYSYVEIPSNLLVQNGIPL
Mod Nsp15:NGEVIWDYTNQIPLYRNTVEVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAANAVLVSTQCYNRYSYVEIPSNLLVQNGIPL

                    *       180         *       200         *       220         *       240
M41 Nsp15:KDGANLVYKRVNGAFVYLPNTLNTQRSYETFGPRSDVERDFLNKSEESFVEKYGKEIGLQHILYGEVDKPQLGGLHTV
Mod Nsp15:KDGANLVYKRVNGAFVYLPNTQNTQRSYETFGPRSDVERDFLNKSEESFVEKYGKEIGLQHILYGEVDKPQLGGLHTV

                    *       260         *       280         *       300         *       320
M41 Nsp15:IGNCRLLRANGLRKSVINSDSDVQNYVLADNGSYKQVCTVVDLLLDDFLELLRNTLRYGTNRSKVVTVSIDYHSIN
Mod Nsp15:IGNCRLLRANGLRKSVINSDSDVQNYVLADNGSYKQVCTVVDLLLDDFLELLRNTLRYGTNRSKVVTVSIDYHSIN

                    *
M41 Nsp15:FNTWFEDGIIKTCYPQLQ
Mod Nsp15:FNTWFEDGIIKTCYPQLQ
```

Nsp16

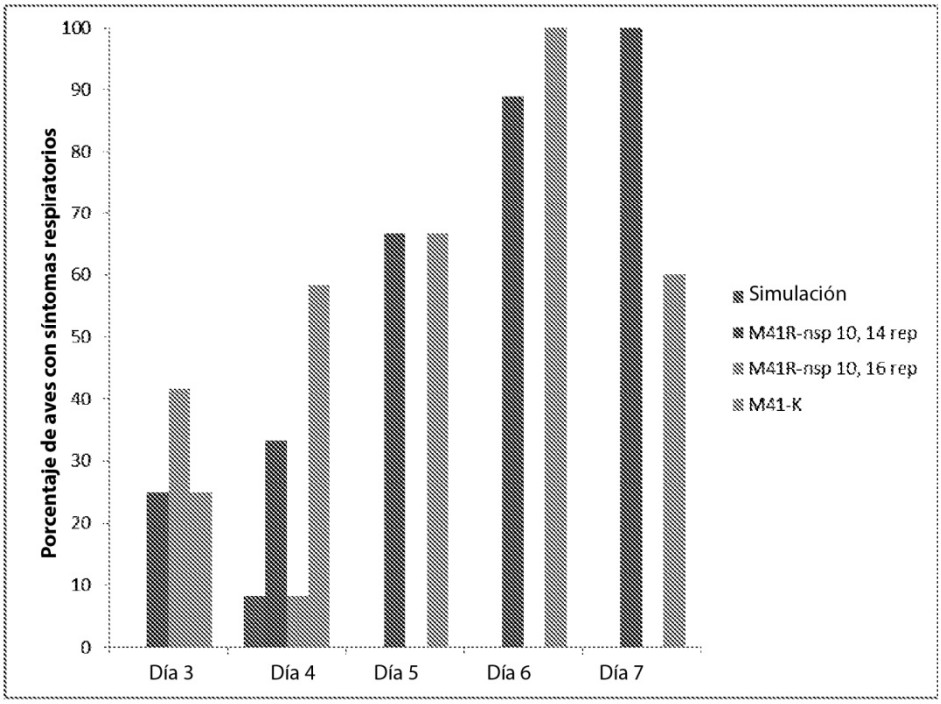
```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
M41 Nsp16:SAWTCGYNMPELYKVQNCVNEFCNIPNVGVGIALPSGIMNSVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGVAPGS
Mod Nsp16:SAWTCGYNMPELYKVQNCVNEFCNIPNVGVGIALPSGIMNSVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGVAPGS

                    *       100         *       120         *       140         *       160
M41 Nsp16:YVLKQWLPEGTLLVNNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYDPNDSKNKHEGVIANNGNDVFIYLSSFLN
Mod Nsp16:FVLKQWLPEGTLLVNNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYDPNDSKNKHEGVIANNGNDVFIYLSSFLN

                    *       180         *       200         *       220         *       240
M41 Nsp16:NNLALRSSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWTMECTAVNASSSEAFLVGVNYLGASCKVNVSGKTLHANYIFWRNCNYL
Mod Nsp16:NNLALRSSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWTMECTAVNASSSEAFLVGVNYLGASCKVNVSGKTLHANYIFWRNCNYL

                    *       260         *       280         *       300
M41 Nsp16:QTSAYSIPDVARYDLRLKATPVVNLKTEQNTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM
Mod Nsp16:QTSAYSIPDVARYDLRLKATPVVNLKTEQNTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM
```

FIGURA 11

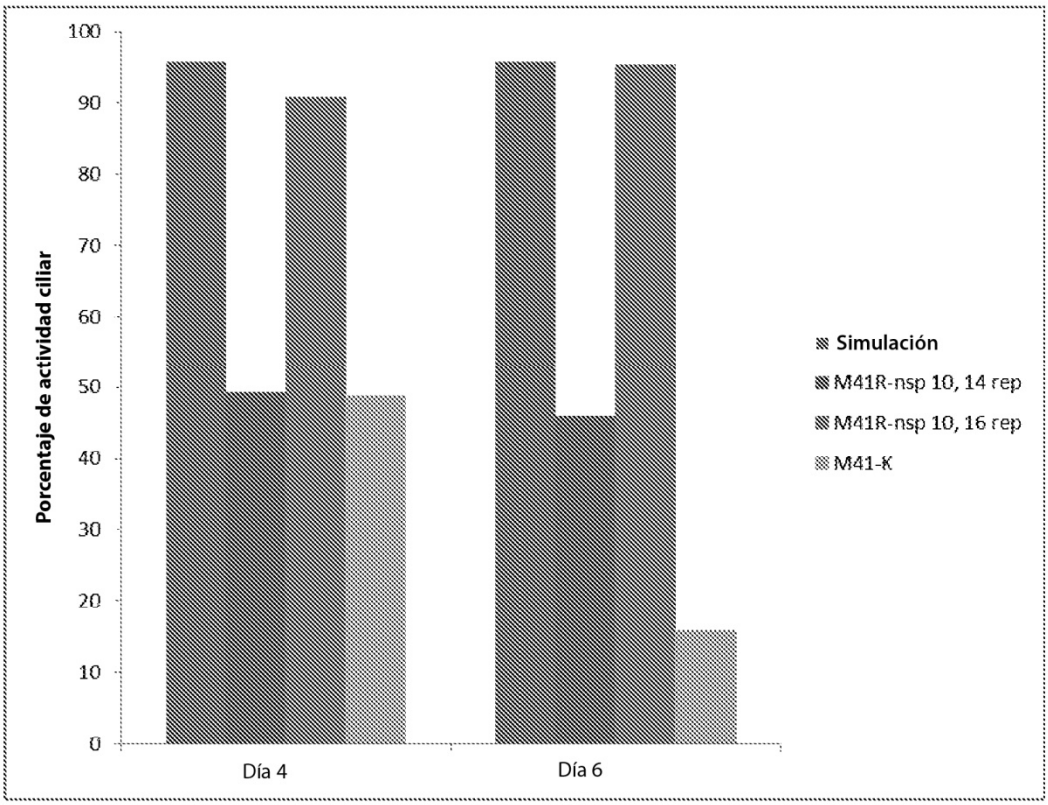
A)


Número medio de tosidos metálicos al minuto por ave
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Simulación
M41R-nsp 10, 14 rep
M41R-nsp 10, 16 rep
M41-K

B)


Porcentaje de aves con síntomas respiratorios
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Simulación
M41R-nsp 10, 14 rep
M41R-nsp 10, 16 rep
M41-K

C)


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Porcentaje de actividad ciliar
Día 4
Día 6
Simulación
M41R-nsp 10, 14 rep
M41R-nsp 10, 16 rep
M41-K